

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/BR04/000224

International filing date: 12 November 2004 (12.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: BR
Number: PI0305197-8
Filing date: 13 November 2003 (13.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 11 January 2005 (11.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

004/000224

PCT/BR 2004/000 224




REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior.
Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Diretoria de Patentes

CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Patente de Invenção
Regularmente depositado no Instituto
Nacional da Propriedade Industrial, sob
Número PI 0305197-8 de 13/11/2003.

Rio de Janeiro, 21 de Dezembro de 2004.


Oscar Paulo Bueno
Chefe do NUCAD
Mat. 449117



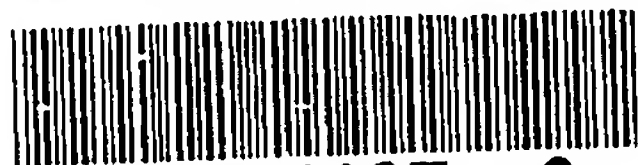
Protocollo

DEPÓSITOS DE PATENTES

Número (21)

DEPÓSITO

Pedido de Patente ou de Certificado de Adição



PI0305197-8

depósito

1

____ (assinatura do depositante e data de depósito)

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ

1.2 Qualificação:

1.3 CNPJ/CPF:

1.4 Endereço completo: Av. Brigadeiro Trompowski, s/nº Cidade Universitária Ilha do Fundão, Rio de Janeiro RJ BRASIL

1.5 **Telefone:**

FAX :

X

continua em folha anexa

2. Natureza:

X 2.1 Invenção

2.1.1 Certificado de Adição

2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

PRODUTO FARMACÊUTICO E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO

[illegible]

continua em folha anexa

Pedido de Divisão do pedido nº.

, de / /

5. **Prioridade Interna** - O depositante reivindica a seguinte prioridade:

Nº de depósito

Data de Depósito / /

(66)

6. **Prioridade** - O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito
		/ /
		/ /
		/ /

[illegible]

continua em folha anexa

7. **Inventor (72):**

() Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: RICARDO AMARAL REMER

7.2 Qualificação: INVENTOR

7.3 Endereço: Rua Eduardo Guinle, No. 60/603 Botafogo Rio de Janeiro RJ BR
ASIL

7.4 CEP: 22260-080

7.5 Telefone

☒ continua em folha anexa

8. **Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

☐ em anexo

9. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):**
(art. 12 da LPI e item 2 do ato Normativo nº 127/97:

☐ em anexo

10. **Procurador (74):**

10.1 Nome e CPF/CGC: ALVES, VIEIRA, LOPES & ATEM ADVOGADOS

03.725.453/0001-73

10.2 Endereço: Praça Floriano, 19 - 6º andar Rio de Janeiro RJ

10.3 CEP: 10.4 Telefone (21) 2532-2243

11. **Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	40 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	4 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de prioridade	0 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	11 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	0 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input type="checkbox"/>	11.9 Outros (especificar):				0 fls.
<input type="checkbox"/>	11.10 Total de folhas anexadas:				58 fls.

12. **Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras**

RJ, 13/11/2003

Local e Data

Assinatura e Carimbo
ALVES, VIEIRA, LOPES & ATEM ADVOGADOS

CNPJ: 03.725.453/0001-73

ANEXO DE INVENTORES

Título: PRODUTO FARMACÊUTICO E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO

Página : 1

Nome: Rogério Margis

Qualificação: INVENTOR

Endereço: Avenida Maracana, 617 - Apto. 505 Rio de Janeiro RJ BRASIL

Cep: 20511-000 Telefone:

Nac:

Dt. Nasc.: / /

Cpf: 431.038.390-49

03

Nome: MARCIO ALVES FERREIRA

Qualificação: INVENTOR

Endereço: Avenida Brigadeiro Trompowski, S/N - Bloco A2, Sala 66 Rio de Janeiro RJ BRASIL

Cep: Telefone:

Nac:

Dt. Nasc.: / /

Cpf: 00870740567

Nome: Márcia Coronha Lima

Qualificação: INVENTOR

Endereço: Avenida Gilberto Amado, No. 383/102 Rio de Janeiro RJ BRASIL

Cep: 22620-060 Telefone:

Ni

Dt. Nasc.: / /

Cpf: 929584277-49

Nome: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Qualificação:

CGC/CPF: 33.781.055/0001-35

Endereço: Avenida Brasil No. 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ BRASIL

Telefone:

Fax:

04

Relatório Descritivo**5 PRODUTO FARMACÊUTICO E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO****Campo da Invenção**

A presente invenção é relacionada a produtos farmacêuticos e a processos para a produção de produtos farmacêuticos. Mais especificamente, a presente invenção é relacionada a produtos farmacêuticos que compreendem grãos de pólen que contêm sua composição protéica alterada através de modificação genética na planta que os produz. Os processos de produção dos referidos produtos farmacêuticos da presente invenção compreendem o cultivo de plantas com modificação genética que proporcione a alteração da composição molecular dos grãos de pólen, tornando-os úteis no tratamento de alergias, doenças autoimunes, na vacinação de mamíferos, e em aplicações diagnósticas *in vitro*.

Antecedentes da Invenção

Os processos de obtenção de compostos economicamente relevantes vêm mudando significativamente nos últimos anos área da Biotecnologia. As fermentações industriais tradicionais, por exemplo, eram a principal opção tecnológica para a produção de polipeptídeos, enzimas, antibióticos e outras substâncias de interesse econômico até recentemente. Entretanto, na medida em que os conhecimentos sobre microbiologia, bioquímica e genética dos organismos envolvidos nos processos fermentativos foram aumentando, as tecnologias de produção foram sendo adaptadas e modificadas. O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular foi marcante neste contexto: além de propiciar ferramentas para a compreensão dos mecanismos bioquímicos, genéticos e evolutivos das muitas espécies estudadas, a Biologia Molecular impulsionou o desenvolvimento de inúmeras alternativas de produção industrial de diversas substâncias, em função da possibilidade de combinação das características de diferentes organismos.

O mercado atual apresenta grande demanda de produtos e processos na área de Saúde Humana e/ou Animal e o interesse no desenvolvimento de tecnologias nesta área continua. Do ponto de vista da tecnologia industrial, vários fatores podem ser considerados como limitantes ou "gargalos" tecnológicos. De especial relevância na produção de substâncias economicamente importantes destacam-se os custos envolvidos na purificação, o que muitas vezes demanda uma série de etapas complexas e custosas. A determinação do custo de novos produtos terapêuticos é um processo bastante complexo, se consideradas as etapas envolvidas desde a concepção do produto até sua colocação no mercado. Um dos fatores que impactam no custo é a tecnologia utilizada, especialmente quando se trata de produtos biológicos cuja síntese química ainda não foi desenvolvida ou que apresenta desvantagens técnicas ou econômicas. O avanço da tecnologia do DNA recombinante possibilitou a produção de proteínas e outras substâncias em quantidades virtualmente ilimitadas. Entretanto, o sistema de expressão utilizado tem marcante influência sobre a natureza do produto e sobre o processo de produção. Um bom exemplo ilustrativo é a produção do Ativador do Plasminogênio de Tecidos (tPA), agente anti-trombolítico utilizado no tratamento de infarto do miocárdio, trombose e embolia pulmonar. Esta substância, quando produzida por *Escherichia coli* ou por cultivo de células de ovário de hamster (CHO) modificadas geneticamente, apresenta diferenças significativas quanto à estrutura (glicosilação, necessidade de renaturação etc.) e ao processo de produção, que reflete no seu preço. Em *E. coli*, 12% dos custos de produção de tPA são referentes a etapa fermentativa do processo, sendo 88% devidos à purificação. Em contrapartida, a produção por CHO apresenta 75% do custo referente ao cultivo celular e 25% na purificação (Datar *et al*, "Process Economics of Animal Cells and Bacterial Fermentations: A Case Study Analysis of Tissue Plasminogen Activator" *Bio/Technology* 11:349-357, 1993). Estas diferenças são significativas, podendo influir decisivamente na escolha do processo a ser utilizado. Entretanto, ainda outros fatores têm especial importância na escolha do sistema de produção, como

capital para a instalação da fábrica, custo das matérias-primas, necessidade de pessoal qualificado (e seu custo) e aspectos ambientais e de segurança.

O Modelo Vegetal

- 5 Um sistema de produção de substâncias de origem biológica mais seguro e econômico pode ser idealizado em plantas transgênicas, cultivadas em áreas contidas (estufas) ou em áreas agrícolas. Adicionalmente, o sistema vegetal de produção de substâncias de interesse farmacêutico oferece várias vantagens, podendo-se mencionar, dentre outras, a ausência de vírus animais e de outros produtos de células animais, além da ausência de contaminações típicas de processos fermentativos bacterianos, de leveduras ou de células animais. Neste contexto, o conhecimento dos mecanismos genéticos e bioquímicos de alguns modelos vegetais é razoavelmente grande, destacando-se, entre outras plantas, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* e *Oryza*
- 10 *Sativa*. Dentre as principais vantagens do uso do sistema vegetal para a produção de substâncias de interesse econômico, enfatiza-se a maior facilidade de aumento de escala, fundamental quando se trata de polipeptídeos e/ou proteínas de interesse industrial. No caso do uso de microrganismos (recombinantes ou não), as etapas envolvidas no aumento de escala, ou
- 15 "scale-up", normalmente são limitantes da economia do processo. Isto ocorre por vários motivos, entre eles a não linearidade das relações determinantes do rendimento do processo (transferência de oxigênio, fatores reológicos, demanda de energia do processo etc.), custo dos equipamentos necessários à produção e necessidade de pessoal adequadamente capacitado. No caso do
- 20 sistema vegetal, os componentes de custo mencionados são muito menores, pois o aumento de escala é mais simples e tende à linearidade. Além disso, na avaliação da economia de um processo industrial, devem ser consideradas algumas estratégias que visem eliminar o maior número possível de etapas de purificação. Além disso, plantas são metabolicamente capazes de realizar
- 25 modificações pós-traducionais complexas como, por exemplo, glicosilações, o
- 30 que amplia o escopo de possíveis antígenos ou candidatos a vacinas a serem

produzidos por plantas. Neste sentido, a estratégia da presente invenção compreende o desenvolvimento de sistemas de expressão que levam em consideração a localização celular e sub-celular mais apropriadas em função dos produtos desejados e, principalmente, da eliminação de etapas de purificação.

Os sistemas reprodutivos de *A. thaliana* e *N. tabacum* têm sido extensamente estudados nos últimos anos e são adequados à lógica da eliminação de etapas de purificação da presente invenção. O ponto de partida para a idealização da presente invenção foi o conhecimento existente sobre os genes envolvidos no desenvolvimento reprodutivo vegetal e, mais particularmente, aqueles relacionados ao desenvolvimento do tapete de antera, há alguns anos um dos objetos de estudo do Laboratório de Genética Molecular Vegetal, Departamento de Genética, Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Trabalhos anteriores do Laboratório de Genética Molecular Vegetal nesta área formam o estado da técnica da presente invenção. De um lado, o conhecimento sobre a expressão dos genes envolvidos na formação da inflorescência de *A. thaliana* (Franco, dissertação de mestrado, UFRJ, 1992) auxiliou na compreensão da função das proteínas tipo oleosina, estudadas mais recentemente com técnicas de biologia molecular associadas à microscopia (Ferreira, tese de doutorado, UFRJ, 1997). De outro lado, estão também disponíveis conhecimentos sobre os mecanismos de regulação dos genes codificantes das proteínas tipo oleosina, estudadas com o auxílio do gene marcador β -glucuronidase (GUS) (Scholte, tese de doutorado, UFRJ, 1998). Ainda mais recentemente, uma estratégia de modificação da composição proteica da superfície externa de grãos de pólen foi descrita por Foster *et al* "Modifying the pollen coat protein composition in Brassica", *Plant Journal* 31(4):477-486, 2002, também descrita no documento WO 99/49063, dos mesmos autores. Entretanto, nem estas nem nenhuma das referências citadas fazem qualquer alusão ou sugestão do uso de plantas modificadas geneticamente como processos de produção de produtos farmacêuticos em tecidos e células do sistema reprodutivo masculino vegetal, nem tampouco ao

uso de grãos de pólen íntegros oriundos de plantas modificadas geneticamente como produtos farmacêuticos para uso em imunoreações, como vacinas ou como reativos para diagnóstico, que coletivamente formam os objetos da presente invenção.

5 Para os efeitos da presente invenção, entende-se como "tecidos e células do sistema reprodutivo masculino vegetal" os tecidos ou células do sistema reprodutivo masculino vegetal, incluindo anteras, tapete de antera, grãos de pólen, partes dos mesmos e combinações dos mesmos. Para os efeitos da presente invenção, entende-se como "imunoreações" todas as reações envolvendo células e/ou moléculas do sistema imune de mamíferos, incluindo células mononucleares como macrófagos e linfócitos B e T, neutrófilos, eosinófilos, além de antígenos, anticorpos, citocinas e outros mediadores químicos do sistema imune, incluindo partes dos mesmos e suas combinações. Para os efeitos da presente invenção, entende-se como 10 "polipeptídeo heterólogo" qualquer seqüência de aminoácidos não naturalmente produzida pela planta, mas cuja síntese na planta decorre da modificação genética realizada na planta da presente invenção. Sem limitar o escopo da presente invenção destaca-se, como de especial importância, o uso de grãos de pólen que contenham pelo menos um polipeptídeo heterólogo.

20 A presente invenção proporciona meios de contornar algumas das dificuldades da técnica de produção e uso de polipeptídeos de interesse terapêutico e/ou diagnóstico. Por um lado, grãos de pólen são estruturalmente estáveis, provavelmente como decorrência da necessidade de sucesso reprodutivo. Assim sendo, sua "evolução" para resistir a estresses ambientais dos mais variados é útil à lógica de uso como produto, uma vez que a elevada estabilidade é favorável e desejável. Em um aspecto adicional, os grãos de pólen da presente invenção podem ser utilizados íntegros em certas aplicações, o que dispensa necessidade de purificação. Como exemplos, aqui usados para ilustrar a presente invenção, mas não para limitar seu escopo, 25 grãos de pólen íntegros contendo polipeptídeos heterólogos possibilitam: a utilização direta como antígenos na confecção de kits de diagnóstico, em 30

especial para *screening*; o seu uso como vacina de aplicação preferencial em mucosas ou por via sub-cutânea.

O pólen é constantemente associado a reações alérgicas associadas à sua presença, pois algumas pessoas apresentam espirros, coceiras, tosse, irritação nasal, lacrimejamento e asma quando expostas ao pólen de certas plantas. Estas partículas são transportadas pelo ar em grande quantidade, normalmente em períodos da primavera. Quando entram em contato com a mucosa nasal ou a garganta, podem disparar reações alérgicas conhecidas como polinose ou rinite alérgica sazonal (para mais detalhes, ver Balda *et al*, "Tree-pollen Allergy is Efficiently Treated by Short-term Immunotherapy (STI) with Seven Preseasonal Injections of Molecular Standardized Allergens". *Allergy* 53, 740-748, 1998). Como qualquer processo alérgico, a polinose é uma sensibilidade elevada a algumas substâncias presentes no pólen, o que varia consideravelmente de pessoa para pessoa, embora pareça haver correlação familiar. Na maioria das reações alérgicas, o sistema imune responde a um "alarme falso", mobilizando o ataque contra o alérgeno. O organismo produz grandes quantidades de IgE específicas, que se ligam aos mastócitos nos tecidos e aos basófilos no sangue. Quando o alérgeno encontra o IgE, ocorre a liberação de histamina, prostaglandinas, leucotrienos e outras substâncias que causam os sintomas da alergia (para mais detalhes, ver Batanero *et al*, "IgE-binding and Histamine-release Capabilities of the Main Carbohydrate Component Isolated from the Major Allergen of Olive Tree Pollen, Ole e 1". *J Allergy Clin Immunol* 103, 147-153, 1999). Algumas estratégias têm sido desenvolvidas para a obtenção de vacinas contra doenças autoimunes e alergias, sendo em geral baseadas na indução da tolerância. Por exemplo, alérgenos conhecidos de grãos de pólen, quando preparados em forma encapsulada, se mostraram eficientes na indução de tolerância mediante administração via nasal. Entretanto, os métodos disponíveis de encapsulação de alérgenos/antígenos são laboriosos e custosos, além de em geral acarretarem a desnaturação dos referidos alérgenos/antígenos. A bordagem da

presente invenção possibilita resolver estes problemas, mediante a produção de alérgenos/antígenos heterólogos em grãos de pólen.

Devido à sua natural habilidade em estimular a produção de IgE e IgG específicas, partimos da hipótese de que pólen poderia vir a ser um bom candidato a carregador e apresentador de antígenos vacinais em mucosas como, por exemplo, para uso direto em imunização pela via nasal. Além da já mencionada elevada estabilidade estrutural do pólen, considera-se como característica adicional da presente invenção possibilitar o uso de grãos de pólen íntegros como vacinas. Interessantemente, uma das metas explicitadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é o desenvolvimento de novos sistemas para delivery de antígenos vacinais ao trato respiratório. Além disso, recentes trabalhos demonstraram que vacinas derivadas de plantas transgênicas, quando aplicadas na forma de pó seco, se apresentam como solução preferida para resolver o problema da falta de homogeneidade das concentrações de antígenos produzidas em plantas (para referências, ver Sala *et al.*, "Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives". *Vaccine* 21:803-808, 2003; Mielcarek *et al.* "Nasal vaccination using live bacterial vectors". *Advanced Drug Delivery Reviews* 51:55-69, 2001). Por outro lado, a recomendação da OMS para a vacina contra o tétano, por exemplo, é a administração de três doses consecutivas do respectivo antígeno. Esta administração repetida apresenta desvantagens econômicas e logísticas, uma vez que parte dos pacientes não retorna para a segunda dose e as campanhas de vacinação têm como fator limitante a necessidade da cadeia de frio, vez que praticamente todas as vacinas são termolábeis. A disponibilidade de vacinas em grãos de pólen se apresenta como capaz de solucionar estes mencionados problemas, sendo de fácil aplicação (sem injeções), facilmente padronizável e de elevada estabilidade térmica, podendo ajudar a contornar os problemas logísticos inerentes às campanhas de vacinação. Estas vantagens abrem boas perspectivas para o estudo e desenvolvimento desta via de imunização em combinação com a forma de apresentação da presente invenção.

Diversos esforços têm sido envidados nas últimas duas décadas no sentido de se desenvolver vacinas de subunidades para uso humano e veterinário. As vacinas de subunidades são baseadas em componentes individuais derivados do agente infeccioso, e normalmente têm baixa imunogenicidade devido à ausência de outros constituintes celulares, dos quais em geral são purificados. Assim sendo, no desenvolvimento de vacinas é desejável planejar a utilização de outras substâncias que tenham o potencial de aumentar a resposta imune aos antígenos em questão, o que é normalmente feito com o uso de adjuvantes. Células inteiras ou partes de células podem funcionar como auto-adjuvantes, o que é favorável à abordagem da presente invenção. A identificação de um antígeno apropriado é apenas o primeiro passo no desenvolvimento de uma vacina de subunidade, pois também são necessários sistemas adjuvantes adequados e sistemas de apresentação (ou "delivery") do respectivo antígeno. Um adjuvante pode ser qualquer material que aumente a resposta imune humoral e/ou celular ao(s) antígeno(s), sendo geralmente aceito na literatura que certos adjuvantes agem através da liberação gradual dos antígenos às células do sistema imune. Trabalhos recentes (Wiedermann, *et al.* "Modulation of an allergic immune response via the mucosal route in a murine model of inhalative type-I allergy" *Intl. Arch. Allergy Immunol.* **118**:129-132, 1999) demonstram que preparações antigênicas na forma particulada também podem aumentar a incorporação de antígenos pelas células processadoras de antígenos do sistema imune. Neste contexto, o uso de grãos de pólen íntegros, devido à sua natureza particulada, propicia esta vantagem adicional para o caso de aplicação em vacinas. Independentemente de se conhecer exatamente o mecanismo específico envolvido, é sabido que tanto a imunidade celular como a humoral podem ser estimuladas em graus variados dependendo do antígeno, do adjuvante, do protocolo de administração e das espécies envolvidas.

Para desenvolver uma vacina efetiva e comercialmente viável, deve ser observada a relação entre os custos de produção e a capacidade de produção em larga escala da preparação antigênica e do sistema adjuvante. Por outro

lado, o número crescente de vacinas em desenvolvimento e do número de injeções requeridas para um programa de imunização amplo em crianças, por exemplo, gera custos elevados e preocupação sobre a potencial descontinuidade de programas de vacinação. Isto torna altamente desejável a disponibilização de vias alternativas de imunização, principalmente aquelas que possibilitem a chamada vacinação multivalente, ou seja, a que possibilite apresentar múltiplos antígenos ou epítomos simultaneamente. Neste contexto, plantas transgênicas têm sido objeto de diversas tentativas de obtenção de vacinas "comestíveis", devido às suas notáveis vantagens em termos de custos de produção e da administração das correspondentes vacinas. Entretanto, as vacinas produzidas em plantas transgênicas destinadas ao consumo oral apresentam a desvantagem de ter que resistir à barreira gastro-intestinal, que destrói significativa porção dos antígenos vacinais. Por conta disso, o estado da técnica demonstra que a quantidade de antígenos requerida para uma efetiva resposta imune mediante administração oral de vacinas produzidas em plantas transgênicas é da ordem de 100 a 1000 vezes maior do que a quantidade de antígenos requerida para uma efetiva imunização parenteral (para referência, ver Carter III, J.E., and Langridge, W.H.R. "Plant-based vaccines for protection against infectious and autoimmune diseases". *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**(2), 93-109, 2002; Streatfield and Howard "Plant-based vaccines". *International Journal for Parasitology* **33**, 479-493, 2003). Assim sendo, persiste a necessidade de desenvolver novas alternativas para contornar esta dificuldade.

A via de entrada da maioria dos agentes patogênicos é a superfície mucosa, sendo que grande parte das infecções é localizada nos tecidos mucosos ou submucosos. Entretanto, as vacinas injetáveis convencionais são pouco eficientes para a indução de resposta imune em mucosas. Em função disso, numerosos trabalhos vem sendo realizados no sentido de disponibilizar alternativas de imunização em mucosas, o que inclui, por exemplo, a incorporação de antígenos em partículas maiores (como lipossomos, complexos imunoestimulatórios, microesferas), que aumentam a eficiência de

A7

resposta imune nos tecidos mucosos. Por outro lado, o uso de adjuvantes adequados é normalmente muito importante para a estimulação do tipo de resposta imune desejada. Dentre os adjuvantes conhecidos, pode-se destacar, no âmbito da presente invenção, os óleos vegetais. Uma vantagem primária do uso de adjuvantes de óleos vegetais sobre o uso de óleos minerais é que os óleos vegetais são metabolizáveis e, portanto, mais facilmente tolerados. A literatura de patentes é repleta de exemplos de uso de óleos vegetais como adjuvantes de vacinas, incluindo as patentes WO 01/95934 "The use of plant oil-bodies in vaccine delivery systems" e WO 02/00169 "Production of vaccines using transgenic plants or modified plant viruses as expression vectors and transencapsidated viral coat proteins as epitope presentation systems". A maioria destas patentes revela formulações e usos de emulsões água-em-óleo ou óleo-em-água, que são preparadas pela mistura de composições químicas puras. Entretanto, nenhum dos documentos citados revela ou sugere o uso de tecidos ou células do sistema reprodutivo masculino vegetal como, por exemplo, grãos de pólen íntegros, ou mesmo partes deles, como produto farmacêutico útil em imunoreações ou como uma combinação antígeno-adjuvante para imunização de aplicação preferencial em mucosas. Neste contexto, a presente invenção proporciona uma alternativa técnica e comercialmente viável de produção de um produto farmacêutico potencialmente útil no tratamento de disfunções do sistema imune de mamíferos, que possibilita, entre outras características, a produção de múltiplas substâncias em um único sistema.

25 **Sumário da Invenção**

Tendo em vista as limitações do estado da técnica e demais relatos citados acima, a presente invenção proporciona produtos farmacêuticos e processo para sua produção em plantas modificadas geneticamente. Os produtos da presente invenção compreendem tecidos e/ou células do sistema reprodutivo masculino vegetal, incluindo substâncias bioativas para uso em Saúde Humana e/ou Animal. Em um aspecto, a presente invenção proporciona

um processo de produção de produtos farmacêuticos que contorna as dificuldades de produção e logística de distribuição e armazenamento dos respectivos produtos. Em um outro aspecto, a presente invenção proporciona um processo de produção de produtos farmacêuticos para uso em imunoreações, através da expressão, em tecidos reprodutivos masculinos vegetais, de genes marcadores, genes codificantes de antígenos e/ou polipeptídeos terapêuticos. Em ainda outro aspecto os produtos farmacêuticos da presente invenção são úteis na imunomodulação de mamíferos. Em um aspecto adicional, os produtos farmacêuticos da presente invenção são potencialmente úteis em reações imunodiagnósticas. Esses e outros aspectos consituem os objetos da presente invenção, e ficarão mais aparentes através de sua descrição detalhada e das respectivas figuras anexas, bem como das reivindicações.

15 **Descrição Detalhada da Invenção**

Para avaliar a aplicabilidade do uso de tecidos e células do sistema reprodutivo masculino vegetal como produtos farmacêuticos, foram avaliadas as situações que poderiam ser consideradas como mais críticas ao seu uso. Assim sendo, as aplicações testadas, embora não limitando o escopo da presente invenção, são apresentadas aqui como o uso de grãos de pólen íntegros como vacinas, imunoterápicos e/ou reativos para diagnóstico. Para tanto, foram desenvolvidas construções gênicas visando à expressão de um gene marcador de forma que sua presença nas estruturas subcelulares vegetais e nos grãos de pólen pudesse ser mais facilmente analisada. Diferentes construções gênicas contendo o gene marcador *gus* (codificante da enzima β -glucuronidase) foram avaliadas: (i) o vetor binário pDE1001 para transformação de plantas de *N. tabacum* contendo o gene marcador *gus* sob controle do promotor PvChit (promotor da quitinase de feijão, *Phaseus vulgaris*, cuja construção gênica foi detalhada em Lima *et al.*, (2002) Bean class IV chitinase promoter is modulated during plant development and under abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 116:512-521, em construção aqui denominada

pPvchit Δ 1200gus, Figura 1) que possibilita a expressão intracelular da enzima glucuronidase (GUS) em grãos de pólen de tabaco; e (ii) o vetor binário para transformação de plantas pCambia 1303 (Figuras 4 e 6) como o receptor das fusões AtGRP17-GUSGFP sob o controle do promotor de uma proteína rica em glicina – AtGRP17 - de *A. thaliana* (anteriormente chamada de AtGRP7 por de Oliveira *et al.* "Inflorescence-specific genes from *Arabidopsis thaliana* encoding glycine-rich proteins". *Plant J.* 3:495-507, 1993). Esta última construção visa possibilitar a expressão da fusão AtGRP17-GUSGFP na superfície externa de grãos de pólen, de forma a viabilizar a testagem dos grãos de pólen assim obtidos para as aplicações propostas na presente invenção.

Exemplo 1 – Obtenção de grãos de pólen de tabaco "WT" e "GM"

Plantas de tabaco (*N. tabacum*) selvagens da linhagem SR1, referidas na presente invenção como "WT", e também plantas de tabaco transformadas com o vetor pPvchit Δ 1200gus (Figura 1), disponíveis de trabalho anterior (Viviane Moreira, tese de doutorado, UFRJ, 2002, também descrita em Lima *et al.*, "Bean class IV chitinase promoter is modulated during plant development and under abiotic stress". *Physiologia Plantarum* 116:512-521, 2002) foram cultivadas em casa de vegetação até a formação de flores maduras. A linhagem de tabaco modificada geneticamente na presente invenção é referida como "GM", e produz grãos de pólen com composição alterada, contendo a enzima GUS em seu interior. Para a coleta dos grãos de pólen, o seguinte procedimento foi adotado: à medida em que ocorria a deiscência, as flores inteiras (Figura 2) eram removidas das plantas selvagens e GM e as anteras íntegras eram transferidas para tubos Eppendorf, com o auxílio de bisturi. O peso médio dos grãos de pólen presentes em cada inflorescência foi medido em balança analítica, fazendo-se a diferenciação entre o peso total com anteras e o peso total sem as anteras, após homogeneização e consequente remoção dos grãos de pólen presentes nas referidas anteras. O peso médio de grãos de pólen presentes em cada flor foi de 1 mg, e, conseqüentemente, de cada antera 0,2 mg, dado que uma flor de *N. tabacum* tem 5 anteras.

Exemplo 2 – Avaliação da estabilidade de GUS em grãos de pólen “GM”

A estabilidade de grãos de pólen mantidos em temperatura ambiente foi avaliada qualitativamente através da verificação da presença da atividade de enzima β glucuronidase (GUS) nos grãos de pólen GM. Para tanto, foram realizadas reações colorimétricas utilizando-se 1 μ L do composto X Gluc em 100 μ L de tampão fosfato 0,1 M pH 7 e grãos de pólen transgênicos íntegros contendo a enzima GUS. Nos testes realizados em laboratório, a atividade da enzima GUS foi mantida por pelo menos um ano de estoque em temperatura ambiente. Neste contexto, é oportuno ressaltar que as condições físico-químicas necessárias à manutenção da atividade uma enzima são muito mais estritas do que as condições necessárias à manutenção da imunogenicidade de uma seqüência polipeptídica. Assim sendo, estes resultados demonstram a elevada estabilidade de polipeptídeos heterólogos expressos em grãos de pólen de *N. tabacum* “GM”, o que é desejável no âmbito das aplicações da presente invenção.

Análise da resposta imune de ratos a Grãos de Pólen de tabaco

Como a presente invenção é relativa a novas tecnologias de produção e formulação de produtos farmacêuticos de especial aplicação em imunoreações, como, por exemplo, imunomoduladores, vacinas e reativos de diagnóstico, a análise da imunoreatividade dos grãos de pólen em diferentes condições é ponto de partida para a avaliação de sua aplicabilidade. A abordagem utilizada aqui incluiu o estudo da resposta imune de ratos (*Ratus norvegicus*) Wistar fêmeas submetidas a diferentes formas de exposição a grãos de pólen.

O potencial dos grãos de pólen em induzir inflamação em ratos após diferentes esquemas de administração de grãos de pólen de tabaco WT foi avaliado. As respostas celulares de animais submetidos a diferentes esquemas de exposição/sensibilização foram monitoradas através contagem das células presentes em lavado bronco alveolar ou em fluido pleural, e através da verificação da formação de edema de pata, enquanto as respostas moleculares

foram monitoradas pela observação de extravasado protéico, medição das concentrações de IgE e IgG totais séricos por ELISA, e de IgG séricos específicos contra proteínas de grãos de pólen por Western Blot.

Grupos de 3 a 6 animais, conforme indicado, foram submetidos a diferentes regimes de administração de suspensões de solução salina contendo grãos pólen de tabaco WT ou GM, nas concentrações de 0, 5, 50 e 500 µg por animal (concentrações tomando por base o peso médio de 1 mg pólen por flor de tabaco), com ou sem a administração conjunta de hidróxido de alumínio (5 mg por animal) como adjuvante. A verificação da ocorrência ou não de inflamação localizada na cavidade bronco-alveolar ou na cavidade pleural foi feita respectivamente através de lavagem bronco-alveolar ou lavagem pleural, seguida de contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer e contagem relativa de monócitos, neutrófilos e eosinófilos após centrifugação sobre lâmina de vidro, sendo ambas as contagens feita com o auxílio de microscópio ótico. Conforme ficará demonstrado nos experimentos que se seguem, em nenhuma das condições testadas houve ocorrência significativa de alteração de contagens celulares consistentes com quadro de inflamação. Adicionalmente, em nenhuma das condições testadas houve alteração do exsudato protéico que fosse típica de quadro inflamatório. Amostras de soro dos animais submetidos às diferentes condições de experimentação foram coletadas e armazenadas para posterior análise molecular. Novamente, em nenhuma das condições de administração de grãos de pólen testadas houve aumento significativo das concentrações de IgE e IgG sérico total, conforme medição quantitativa por ELISA. Os resultados das tabelas a seguir demonstram que nenhuma das diferentes condições de administração de grãos de pólen aos animais acarretou reações do tipo alérgico-inflamatórias.

Exemplo 3 – Resposta imune de ratos submetidos a uma única injeção intrapleural

5 Tabela 1 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Os animais foram submetidos a uma injeção intrapleural de 5 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem (100 µL em solução salina). A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	17	85	15	0	4,34	0,77	0
2	25	83	17	0	6,23	1,28	0
3	16	85	15	0	4,08	0,72	0
Media					4,88	0,92	0
Desvio					1,17	0,31	0
E.P.M					0,83	0,22	0

10 Legendas: CAM Leu tot, leucócitos totais contados em câmara de Neubauer; Mono, monócitos; Eos, eosinófilos; Neut, neutrófilos; E.P.M., erro padrão da média.

15 Tabela 2 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Os animais foram submetidos a uma injeção intrapleural de 50 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem (100 µL em solução salina). A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	17	86	14	0	4,39	0,71	0
2	12	78	22	0	2,81	0,79	0
3	17	88	11	1	4,49	0,56	0,05
Media					3,89	0,69	0,02
Desvio					0,94	0,12	0,03
E.P.M					0,67	0,08	0,02

20

25 Tabela 3 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Os animais foram submetidos a uma injeção intrapleural de 500 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem (100 µL em solução salina). A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	20	82	18	0	4,92	1,08	0
2	21	81	19	0	5,10	1,20	0
3	23	89	11	0	6,14	0,76	0
Media					5,39	1,01	0
Desvio					0,66	0,23	0
E.P.M					0,47	0,16	0

Os resultados das tabelas 1-3 demonstram que em nenhuma das condições testadas houve alteração estatisticamente significativa das contagens celulares em lavado pleural, indicando que a administração de grãos de pólen nestas condições não induz a resposta inflamatória característica das alergias. Em vista destes resultados, uma nova bateria de experimentos foi conduzida utilizando um número maior de animais e de exposições aos grãos de pólen.

10

Exemplo 4 – Resposta imune de ratos submetidos a sucessivas injeções intrapleurais

Tabela 4 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção intrapleural de solução salina (como controle, 100 μ L por animal) em três exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio por injeção intrapleural de 5 μ g de grãos de pólen em volume de 100 μ L por animal.

20

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	44	78	3	19	11,67	0,45	2,84
2	30	78	17	5	7,02	1,53	0,45
3	24	77	16	7	5,54	1,15	0,50
Media					8,08	1,04	1,27
Desvio					3,20	0,55	1,37
E.P.M					2,26	0,39	0,97

- 5 Tabela 5 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção intrapleural de 5 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem (em solução salina; injeção de 100 µL por animal) em três exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio por injeção intrapleural de 5 µg de grãos de pólen em volume de 100 µL por animal.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	27	85	13	2	6,89	1,05	0,16
2	45	77	8	15	10,40	1,08	2,03
3	52	64	11	25	11,32	1,94	4,42
4	85	69	8	23	19,94	2,31	6,65
Media					12,13	1,60	3,31
Desvio					5,54	0,63	2,82
E.P.M					3,20	0,36	1,63

10

- 15 Tabela 6 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção intrapleural de 50 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem (em solução salina; injeção de 100 µL por animal) em três exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio por injeção intrapleural de 50 µg de grãos de pólen em volume de 100 µL por animal.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	50	68	14	18	10,20	2,10	2,70
2	37	69	14	17	7,66	1,55	1,89
3	145	71	16	13	37,06	8,35	6,79
4	36	81	10	9	8,75	1,08	0,97
Media					15,92	3,27	3,09
Desvio					14,13	3,41	2,57
E.P.M					8,16	1,97	1,48

- 20 Tabela 7 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção intrapleural de 500 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem (em solução salina; injeção de 100 µL por animal) em três exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4

h após desafio por injeção intrapleural de 500 μg de grãos de pólen em volume de 100 μL por animal.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	67	77	7	16	19,60	1,78	4,07
2	86	55	7	38	16,08	2,05	11,11
3	136	56	17	27	30,46	9,25	14,69
4	147	43	4	53	25,28	2,35	31,16
Media					22,86	3,86	15,26
Desvio					6,33	3,60	11,48
E.P.M.					3,66	2,08	6,63

- 5 Os resultados das tabelas 4-7 demonstram que não houve alteração estatisticamente significativa das contagens celulares em lavado pleural nas condições de administração consecutiva de 5 e 50 μg de grãos de pólen. Na condição de administração de 500 μg de grãos de pólen houve significativo aumento nas contagens de células mononucleares e neutrófilos, e aumento (embora não significativo estatisticamente) de eosinófilos. Estes resultados são também apresentados na figura 3, painéis A, B e C, respectivamente. O aumento observado nas contagens celulares dos animais submetidos à administração de 500 μg de grãos de pólen demonstra que os animais são responsivos somente em concentrações extremas de grãos de pólen.
- 10 Entretanto, a administração intrapleural de grãos de pólen na faixa de concentração de até 50 μg por animal, em 3 administrações consecutivas, não induz resposta inflamatória característica das alergias. Como as condições típicas de administração intrapleural de antígenos dificilmente excede a concentração de 20 μg por animal, estes resultados demonstram que injeções intrapleurais de grãos de pólen podem, surpreendentemente, ser utilizadas em esquemas de imunização ou imunoterapia em animais, sem com isso induzir a formação de quadro tipo alérgico-inflamatório. Para verificar a resposta dos animais submetidos à administração de grãos de pólen pela via intranasal, uma outra bateria de experimentos foi conduzida, conforme demonstrado nas
- 20 tabelas a seguir.
- 25

Exemplo 5 – Resposta imune de ratos submetidos a duas sucessivas instilações intranasais

- 5 Tabela 8 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação intra-nasal de solução salina (como controle, 50 μ L por narina em cada animal) em duas exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar de animais normais 4 h após a última instilação.

N	CAM Leu tot	Mono cont.	Eos cont.	Neut cont.	Mono Milhar.	Eos Milhar.	Neut Milhar.
1	74	73	9	18	1351	167	333
2	28	89	0,5	10,5	623	4	74
3	45	99	1	0	1114	11	0
4	26	30	0	70	195	0	455
Media					820,6	45,3	215,4
Desvio					515,5	80,9	214,3
E.P.M.					297,6	46,7	123,7

- 15 Tabela 9 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação intra-nasal de 5 μ g de grãos de pólen de tabaco selvagem (em solução salina; instilação de 50 μ L por narina) por animal em duas exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar 4 h após a última instilação intra-nasal.

20

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhares	Eos milhares	Neut milhares
1	127,5	54	23	23	1721	701	765
2	64	70	0	30	1120	0	480
3	81	71	0	29	1438	0	587
4	41	97	0	3	994	0	31
5	38,5	85	0	15	818	0	144
Media					1218,3	140,3	401,5
Desvio					360,9	313,6	306,7
E.P.M.					180,5	156,8	153,4

Tabela 10 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação intra-nasal de 50 μ g de

grãos de pólen de tabaco selvagem (em solução salina; instilação de 50 µL por narina) por animal em duas exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar 4 h após a última instilação intra-nasal.

5

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhares	Eos milhares	Neut milhares
1	223	46	0	54	2565	0	3011
2	147	62	1	38	2279	37	1397
3	37	95	0	5	879	0	46
4	30	97	0	3	728	0	23
5	68	100	0	0	1700	0	0
Media					1629,9	7,4	895,2
Desvio					943,7	18,4	1323,8
E.P.M.					409,1	8,2	661,9

10

Tabela 11 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação nasal de 500 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem (em solução salina; instilação de 50 µL por narina) por animal em duas exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar 4 h após a última instilação intra-nasal.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhares	Eos milhares	Neut milhares
1	68,5	70	0	30	1199	0	514
2	48	77	0	23	924	0	276
3	86	62	0	38	1333	0	817
4	135	62,5	0	37,5	2109	0	1266
media					1391,3	0	718,1
desvio					508,1	0	426,9
E.P.M.					293,3	0	246,5

15

Exemplo 6 – Resposta imune de ratos submetidos a três sucessivas instilações intranasais

20

Tabela 12 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação nasal de solução salina (como controle, 50 µL por narina em cada animal) em três exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar de animais normais.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono Milhares	Eos milhares	Neut milhares
1	49	83	0	17	1017	0	208
2	35	96	0	4	840	0	35
3	69	59	0	41	1018	0	707
4	47	84	0	6	987	0	71
5	58	57	0	43	827	0	624
media					937,6	0	328,9
desvio					96,2	0	315,3
E.P.M.					48,1	0	157,6

5 Tabela 13 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação intra-nasal de 5 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem (em solução salina; instilação de 50 µL por narina) por animal em três exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar 4 h após a última instilação intra-nasal.

N	CAM Leu tot	Mono cont.	Eos cont.	Neut cont.	Mono milhares	Eos milhares	Neut milhares
1	79	53	0	47	1047	0	928
2	60	60	4	36	900	60	540
3	53,6	31	0	69	415	0	925
4	103	62	0	38	1597	0	979
media					989,7	15	842,8
desvio					486,3	30	203,4
E.P.M.					280,7	17,3	117,4

10 Tabela 14 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação intra-nasal de 50 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem (em solução salina; instilação de 50 µL por narina) por animal em três exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar 4 h após a última instilação intra-nasal.

15

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %.	Mono milhares	Eos milhares	Neut milhares
1	119	37	0	63	1101	0	1874
2	93	88	0	12	2046	0	279
3	66	97	0	3	1601	0	50
4	86	77	3	20	1656	65	430
media					1600,7	16,1	658,2
desvio					387,8	32,3	825,7
E.P.M.					223,9	18,6	476,7

- 5 Tabela 15 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação intra-nasal de 500 μg de grãos de pólen de tabaco selvagem (em solução salina; instilação de 50 μL por narina) por animal em três exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar 4 h após a última instilação intra-nasal.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhares	Eos milhares	Neut milhares
1	83	50	0	50	1038	0	1038
2	90	82	0	18	1845	0	405
3	104	98	0	2	2548	0	52
4	53	47	0	53	623	0	702
5	45	66	0	34	743	0	383
media					1359,2	0	515,9
desvio					817,8	0	371,5
E.P.M.					408,9	0	185,8

10

- 15 Os resultados das tabelas 12-15 demonstram que em nenhuma das condições testadas houve alteração estatisticamente significativa das contagens celulares em lavado bronco-alveolar, indicando que a administração de grãos de pólen nestas condições não induz a resposta inflamatória característica das alergias. Em vista destes resultados, uma nova bateria de experimentos foi conduzida utilizando um número maior de animais e de exposições aos grãos de pólen. Estes resultados são também apresentados na
- 20 figura 3, painéis A, B e C, respectivamente, que demonstram claramente que não houve alteração estatisticamente significativa das contagens celulares em lavado pleural nas condições de administração consecutiva de 5, 50 e 500 μg de grãos de pólen.

Exemplo 7 – Resposta imune de ratos submetidos a uma injeção subcutânea seguida de “booster” – desafio com 10 µg de grãos de pólen na cavidade pleural.

- 5 Tabela 16 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural de animais normais não submetidos a nenhum esquema de sensibilização ou desafio.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	39	87	12	1	11,5	1,6	0,1
2	34	81	19	0	8,3	1,9	0
3	26	89	11	0	7,4	0,9	0
4	33	77	23	0	7,6	2,3	0
5	40	86	13	1	11,7	1,8	0,1
Media					9,3	1,70	0,05
Desvio					2,13	0,51	0,07
E.P.M.					1,07	0,25	0,04

10

- 15 Tabela 17 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção subcutânea de solução salina (segundo controle, 100 µL por animal) seguida de *booster* nas mesmas condições após 7 dias. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio (7 dias após o *booster*, ou seja, no dia 14) por injeção intrapleural de 10 µg de grãos de pólen em volume de 100 µL de solução salina por animal.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	29	67	33	0	6,6	3,3	0
2	53	24	5	71	3,9	0,8	11,7
3	39	63	36	1	7,4	4,2	0,1
Media					5,97	2,76	3,93
Desvio					1,8	1,75	6,70
E.P.M.					1,27	1,24	4,74

20

- 25 Tabela 18 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção subcutânea de 50 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem – WT (100 µL por animal, em solução salina) seguida de *booster* nas mesmas condições após 7 dias. A tabela

apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio (7 dias após o *booster*, ou seja, no dia 14) por injeção intrapleural de 10 µg de grãos de pólen em volume de 100 µL de solução salina por animal.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	31	51	35,5	13,5	6	4,2	1,6
2	24	80	17,5	2,5	6,1	1,3	0,2
3	29	63	30,5	6,5	5,5	2,7	0,6
4	26	50	46	4	3,9	3,3	0,6
5	28	82	14	4	7,3	1,3	0,4
Media					5,78	2,54	0,67
Desvio					1,25	1,26	0,54
E.P.M.					0,63	0,63	0,27

Tabela 19 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção subcutânea de 500 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem - WT (100 µL por animal, em solução salina) seguida de *booster* nas mesmas condições após 7 dias. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio (7 dias após o *booster*, ou seja, no dia 14) por injeção intrapleural de 10 µg de grãos de pólen em volume de 100 µL de solução salina por animal.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	48	49	6	45	8	0,98	7,34
2	47	53	10	37	8,97	1,69	6,26
3	61	76	5	19	14,8	0,98	3,71
4	33	89	10	1	8,8	0,99	0,10
5	41	62	3	35	8,6	0,42	4,88
Media					9,85	1,01	4,46
Desvio					2,81	0,45	2,80
E.P.M.					1,41	0,23	1,40

Tabela 20 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção subcutânea de 50 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem – WT (100 µL por animal, em solução salina com 5 mg de hidróxido de alumínio, como adjuvante) seguida de *booster* nas mesmas condições após 7 dias. A tabela apresenta as contagens celulares

em lavado pleural 4 h após desafio (7 dias após o *booster*, ou seja, no dia 14) por injeção intrapleural de 10 μ g de grãos de pólen em volume de 100 μ L de solução salina por animal.

n	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	49	77	8	15	13,58	1,41	2,65
2	23	76	17	7	5,94	1,33	0,55
3	49	73	13	14	11,09	1,97	2,13
4	33	82	15	3	8,12	1,49	0,30
5	56	56	15	29	9,41	2,52	4,87
media					9,63	1,74	2,10
desvio					2,90	0,50	1,85
E.P.M.					1,45	0,25	0,92

Tabela 21 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção subcutânea de 500 μ g de grãos de pólen de tabaco selvagem - WT (100 μ L por animal, em solução salina com 5 mg de hidróxido de alumínio, como adjuvante) seguida de *booster* nas mesmas condições após 7 dias. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio (7 dias após o *booster*, ou seja, no dia 14) por injeção intrapleural de 10 μ g de grãos de pólen em volume de 100 μ L de solução salina por animal.

n	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	47	67	2	31	11,34	0,34	5,25
2	94	62	5	33	22,15	1,79	11,79
3	32	68	3	29	6,96	0,31	3
4	56	69	4	27	12,36	0,72	4,84
5	52	71	18	11	11,08	2,81	1,72
media					12,78	1,19	5,31
desvio					5,63	1,08	3,89
E.P.M.					2,81	0,54	1,95

Exemplo 8 – Resposta imune de ratos submetidos a uma injeção subcutânea seguida de “booster” – desafio com 20 µg de grãos de pólen na cavidade pleural.

- 5 Tabela 22 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção subcutânea de solução salina (controle, 100 µL por animal) seguida de *booster* nas mesmas condições após 7 dias. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural de animais normais não submetidos a nenhum esquema de sensibilização ou
- 10 desafio.

n	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	15	89	11	0	4,3	0,5	0
2	25	84	16	0	6,3	1,2	0
3	14	71	25	4	3,2	1,1	0,2
4	21	88	12	0	5,9	0,8	0
media					4,92	0,91	0,04
desvio					1,45	0,31	0,09
E.P.M.					0,84	0,18	0,05

- 15 Tabela 23 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção subcutânea de solução salina (segundo controle, 100 µL por animal) seguida de *booster* nas mesmas condições após 7 dias. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio (7 dias após o *booster*, ou seja, no dia 14) por injeção
- 20 intrapleural de 20 µg de grãos de pólen em volume de 100 µL de solução salina por animal.

n	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	34	69	31	0	7,0	3,2	0
2	21	81	18	1	5,3	1,3	0,1
3	48	87	11	2	13,2	1,8	0,3
4	28	65	31	4	5,8	2,8	0,4
5	12	78	20	2	3	0,8	0,1
media					6,88	1,98	0,16
desvio					3,83	0,99	0,16
E.P.M.					1,92	0,50	0,08

- 5 Tabela 24 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção subcutânea de 50 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem (100 µL por animal, em solução salina com 5 mg de hidróxido de alumínio, como adjuvante) seguida de *booster* nas mesmas condições após 7 dias. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio por injeção intrapleural de 20 µg de grãos de pólen em volume de 100 µL de solução salina por animal.

n	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	22	78	21	1	5,5	1,5	0,1
2	40	71,5	26,5	2	8,6	3,2	0,2
3	16	78	21	1	4,2	1,1	0,1
4	19	88	12	0	5,7	0,8	0
5	19	81	10	9	5,2	0,6	0,6
6	24	75	17	8	5,9	1,3	0,6
media					12,96	1,43	0,26
desvio					6,17	0,92	0,28
E.P.M.					2,76	0,41	0,12

10

- 15 Tabela 25 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Injeção subcutânea de 100 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem (100 µL por animal, em solução salina com 5 mg de hidróxido de alumínio, como adjuvante) seguida de *booster* nas mesmas condições após 7 dias. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado pleural 4 h após desafio por injeção intrapleural de 20 µg de grãos de pólen em volume de 100 µL de solução salina por animal.

n	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	32	81	16	3	8,81	1,74	0,33
2	15	80,5	19	0,5	4,11	0,97	0,03
3	19	84	15	1	5,11	0,91	0,06
4	27	69	27	4	5,96	2,33	0,35
5	23,25	78	22	0	6,89	1,9	0
6	23,25	80	9	11	6,32	0,7	0,87
media					6,20	1,43	0,27
desvio					1,61	0,66	0,33
E.P.M.					0,72	0,29	0,15

20

Exemplo 9 – Resposta imune de ratos submetidos a uma injeção subcutânea de grãos de pólen seguida de *booster* – desafio por injeção subplantar de 20 µg de grãos de pólen.

5 Dois grupos de animais foram submetidos a uma injeção subcutânea (100 µL por animal) de suspensões de grãos de pólen nas seguintes condições:

1 – Injeção subcutânea de 50 µg de grãos de pólen em solução salina e hidróxido de alumínio como adjuvante (5 mg por animal); e

10 2 – Injeção subcutânea de 100 µg de grãos de pólen em solução salina e hidróxido de alumínio como adjuvante (5 mg por animal).

Uma semana após estas injeções subcutâneas (dia 7) os grupos de animais foram submetidos a uma nova injeção subcutânea (*booster*) nas mesmas respectivas concentrações de grãos de pólen, porém sem adjuvante. Após uma
15 semana (dia 14) todos os grupos de animais foram desafiados por injeção subplantar (50 µL) de suspensões de 20 µg de grãos de pólen. Não houve formação de edemas de pata em nenhuma das condições avaliadas.

Exemplo 10 – Resposta imune de ratos submetidos a uma instilação intranasal de grãos de pólen seguida de *booster* – desafio por injeção subplantar de 20 µg de grãos de pólen.

20 Quatro grupos de animais foram submetidos a uma instilação intranasal (50 µL por narina) de suspensões de grãos de pólen nas seguintes condições:

25 1 – Instilação intranasal de 50 µg de grãos de pólen em solução salina;

2 - Instilação intranasal de 25 µg de grãos de pólen em solução salina;

3 - Instilação intranasal de 50 µg de grãos de pólen em solução salina e hidróxido de alumínio como adjuvante (5 mg por animal); e

30 4 - Instilação intranasal de 25 µg de grãos de pólen em solução salina e hidróxido de alumínio como adjuvante (5 mg por animal).

Uma semana após estas instilações nasais (dia 7) os grupos de animais foram submetidos a uma nova administração intranasal (*booster*) nas mesmas respectivas concentrações de grãos de pólen, porém sem adjuvante. Após uma semana (dia 14) todos os grupos de animais foram desafiados por injeção subplantar (50 μ L) de suspensões de 20 μ g de grãos de pólen. Não houve formação de edemas de pata em nenhuma das condições avaliadas.

Exemplo 11 - Resposta imune de ratos submetidos a sucessivas instilações intranasais com grãos de pólen de tabaco WT e GM.

Grupos de animais foram submetidos à instilação intranasal (50 μ L por narina) de suspensões de pólen selvagem (WT) ou transgênico (GM, cujos grãos de pólen contêm a proteína GUS), nas concentrações de 0, 5 e 50 μ g totais de pólen por animal. Três instilações foram realizadas com intervalos de 7 dias, sendo posteriormente feita lavagem bronco-alveolar e contagem de células.

Tabela 26 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. norvegicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação nasal de solução salina (controle; 50 μ L por narina) por animal em três exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar 4 h após última instilação nas condições descritas acima.

n	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	7	70	0	30	0,123	0	0,053
2	6	96	0	4	0,144	0	0,006
3	10	60	0	40	0,15	0	0,1
media					0,138	0	0,053
desvio					0,014	0	0,047
E.P.M.					0,01	0	0,033

5 Tabela 27 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação nasal de 5 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem - WT (em solução salina; instilação de 50 µL por narina) por animal em três exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar 4 h após última instilação nas condições descritas acima.

n	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	54	51	0	49	0,689	0	0,662
2	50	48	0	52	0,6	0	0,65
3	27	55	0	45	0,371	0	0,304
4	28	43	0	57	0,301	0	0,399
media					0,49	0	0,503
desvio					0,184	0	0,18
E.P.M.					0,106	0	0,104

10

15 Tabela 28 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação nasal de 5 µg de grãos de pólen de tabaco transgênico – GM (em solução salina; instilação de 50 µL por narina) por animal em três exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar 4 h após última instilação nas condições descritas acima.

n	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut Milhões
1	48	30	0	70	0,36	0	0,84
2	29	58	0	42	0,421	0	0,305
3	75	37	1	62	0,694	0,019	1,163
4	39	63	0	37	0,614	0	0,361
media					0,522	0,005	0,667
desvio					0,157	0,009	0,408
E.P.M.					0,091	0,005	0,236

20

25 Tabela 29 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação nasal de 50 µg de grãos de pólen de tabaco selvagem - WT (em solução salina; instilação de 50 µL por narina) por animal em três exposições sucessivas com intervalo de uma

semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar 4 h após última instilação nas condições descritas acima.

n	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	172	4	0	96	0,172	0	4,128
2	24	51	0	49	0,306	0	0,294
3	109	20	0	80	0,545	0	2,180
4	39	66	0	34	0,644	0	0,332
5	104	56	0	44	1,456	0	1,144
media					0,624	0	1,615
desvio					0,216	0	1,6
E.P.M.					0,25	0	0,8

Tabela 30 – Condições experimentais de exposição de grãos de pólen a *R. novergicus* Wistar e respectivos resultados. Instilação nasal de 50 µg de grãos de pólen de tabaco transgênico – GM (em solução salina; instilação de 50 µL por narina) por animal em três exposições sucessivas com intervalo de uma semana entre cada exposição. A tabela apresenta as contagens celulares em lavado bronco-alveolar 4 h após última instilação nas condições descritas acima.

N	CAM Leu tot	Mono %	Eos %	Neut %	Mono milhões	Eos milhões	Neut milhões
1	31	92	0	8	0,713	0	0,062
2	65	70	0	30	1,138	0	0,488
3	22	44	3	53	0,242	0,02	0,292
4	40	48	0	52	0,480	0	0,52
5	35	55	0	45	0,481	0	0,394
media					0,610	0,003	0,351
desvio					0,338	0,007	0,184
E.P.M.					0,169	0,004	0,092

Os resultados das tabelas 26-30 são melhor visualizados na figura 3 painéis D-F, e indicam não ter ocorrido, em nenhuma das concentrações de grãos de pólen administradas pela via intranasal, qualquer alteração significativa nas contagens celulares que seriam típicas de reação alérgico-inflamatória. A diferença estatisticamente significativa entre as contagens de

células mononucleares e de neutrófilos após a administração de grãos de pólen WT e GM (Figura 3, painéis D e E) é surpreendente e vantajosa no que diz respeito aos propósitos da presente invenção, pois demonstra que os grãos de pólen com composição modificada (GM), quando em concentrações de 50 µg, têm menor potencial de induzir inflamação na cavidade bronco alveolar do que grãos de pólen de tabaco selvagem (WT).

Exemplo 12 - Resposta imune de ratos submetidos a diferentes esquemas de administração de grãos de pólen – medição de IgG sérico total por ELISA.

A tabela 31 apresenta os dados de concentração de IgG sérico dos animais submetidos às condições descritas no exemplo 6, tabelas 12-15.

Tabela 31. Dados das concentrações de IgG sérico total, em µg/mL, em amostras de soro de animais submetidos a 3 sucessivas administrações intranasais, com um intervalo de uma semana entre cada administração, de suspensões de grãos de pólen de tabaco tipo selvagem (WT) em diferentes concentrações.

Animal	Salina	WT 5 µg	WT 50 µg	WT 500 µg
1	1125,6	1441,5	1123,3	1012,7
2	1367	1337,7	1459,5	1461,8
3	1376	1084,9	1414,4	1152,6
4	1545,3	836,7	1511,4	918
5	1504,6			1015
6				1488,9
n	5	4	4	6
media	1383,7	1175,2	1377,2	1174,8
desvio	164,1	270,8	173,8	244,7
E.P.M.	82,0	156,4	100,4	109,4

A tabela 32 apresenta os dados de concentração de IgG sérico dos animais submetidos às condições descritas no exemplo 7, tabelas 16 e 19-21.

células mononucleares e de neutrófilos após a administração de grãos de pólen WT e GM (Figura 3, painéis D e E) é surpreendente e vantajosa no que diz respeito aos propósitos da presente invenção, pois demonstra que os grãos de pólen com composição modificada (GM), quando em concentrações de 50 µg, têm menor potencial de induzir inflamação na cavidade bronco alveolar do que grãos de pólen de tabaco selvagem (WT).

Exemplo 12 - Resposta imune de ratos submetidos a diferentes esquemas de administração de grãos de pólen – medição de IgG sérico total por ELISA.

A tabela 31 apresenta os dados de concentração de IgG sérico dos animais submetidos às condições descritas no exemplo 6, tabelas 12-15.

Tabela 31. Dados das concentrações de IgG sérico total, em µg/mL, em amostras de soro de animais submetidos a 3 sucessivas administrações intranasais, com um intervalo de uma semana entre cada administração, de suspensões de grãos de pólen de tabaco tipo selvagem (WT) em diferentes concentrações.

Animal	Salina	WT 5 µg	WT 50 µg	WT 500 µg
1	1125,6	1441,5	1123,3	1012,7
2	1367	1337,7	1459,5	1461,8
3	1376	1084,9	1414,4	1152,6
4	1545,3	836,7	1511,4	918
5	1504,6			1015
6				1488,9
n	5	4	4	6
media	1383,7	1175,2	1377,2	1174,8
desvio	164,1	270,8	173,8	244,7
E.P.M.	82,0	156,4	100,4	109,4

A tabela 32 apresenta os dados de concentração de IgG sérico dos animais submetidos às condições descritas no exemplo 7, tabelas 16 e 19-21.

- 5 Tabela 32. Dados das concentrações de IgG sérico total, em $\mu\text{g/mL}$, em amostras de soro de animais submetidos a uma injeção intrapleural de diferentes concentrações de grãos de pólen de tabaco tipo selvagem (WT), com ou sem adjuvante (AlOH_3), seguida de nova administração (*booster*) uma semana depois, nas mesmas condições e desafio, uma semana depois, por injeção intrapleural de 10 μg de grãos de pólen.

Animal	Salina	500 μg	50 μg + AlOH_3	500 μg + AlOH_3
1	942,8	956,3	981,1	951,8
2	807,4	665,2	906,7	1037,5
3	1024	836,7	678,8	1367
4	784,8	884,1	1100,7	960,8
5			954,1	1673,9
n	4	4	5	5
media	889,8	835,6	924,3	1198,2
Desvio	113,5	123,8	154,8	315,3
E.P.M.	65,5	71,5	77,4	157,7

- 10 A tabela 33 apresenta os dados de concentração de IgG sérico dos animais submetidos às condições descritas no exemplo 11, tabelas 26-30.

- 15 Tabela 33. Dados das concentrações de IgG sérico total, em $\mu\text{g/mL}$, em amostras de soro de animais submetidos a 3 sucessivas administrações intranasais, com um intervalo de uma semana entre cada administração, de suspensões de grãos de pólen de tabaco tipo selvagem (WT) ou modificado geneticamente (GM) em diferentes concentrações.

Animal	Salina	WT 5 μg	WT 50 μg	GM 5 μg	GM 50 μg
1		1098,5	1069,1	967,6	523,1
2	1130,1	1457,3	1247,4	1062,4	784,8
3	1470,8	1078,2	931,5	1299,3	978,9
4	1283,5	1367	958,6	1048,8	893,1
5	1479,8	723,9	1103		744,2
n	4	5	5	4	5
media	1341,1	1145,0	1061,9	1094,5	784,8
desvio	167,2	287,6	126,3	142,8	172,9
E.P.M.	96,6	143,8	63,2	82,4	86,4

Exemplo 13 – Análise da resposta imune de ratos submetidos a sucessivas injeções subcutâneas de grãos de pólen reconhecidos como alergênicos (*Betula fontinallis*)

5

Visando submeter animais a condições de confirmada resposta inflamatória e/ou alérgica, de forma a eliminar a hipótese de que os animais utilizados poderiam ser não responsivos, novos ensaios foram idealizados com o uso de grãos de pólen conhecidos na literatura como associados a eventos alérgicos (Ahlholm *et al*, "Genetic and Environmental Factors Affecting the Allergenicity of Birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii* [Orl.] Hamet-ahti) Pollen" *Clin. Exp. Allergy* 28:1384-1388, 1998). Neste sentido, grãos de pólen de *Betula fontinallis* foram adquiridos comercialmente e utilizados em experimentos com ratos, como se segue.

10

15 Grupos de 5 animais foram submetidos à exposição a grãos de pólen nas seguintes condições:

Grupo 1 - Injeção subcutânea (100 µL por animal):

20

- Suspensão de pólen *Betula* (100 µg/animal) em salina;
- Suspensão de pólen *Betula* (100 µg/animal) em salina + Al(OH)₃ (5 mg/animal); e
- Suspensão de pólen de tabaco selvagem, - WT (100 µg/animal) em salina + Al(OH)₃ (5 mg/animal).

Grupo 2 - Instilação (50 µL por narina):

25

- Suspensão de pólen *Betula* (100 µg/animal) em salina + Al(OH)₃ (5 mg/animal).

30

Após oito semanas de exposições sucessivas nas condições acima descritas o grupo 1 foi submetido a desafio, mediante injeção em *foot pad*, de 50 µg de suspensão de grãos de pólen (50 µL) e medição do volume das patas dos animais em pletismômetro. Os resultados da tabela 34 indicam ter havido

41
formação de edema nos animais submetidos a injeções subcutâneas de pólen de tabaco WT e, em menor grau, com pólen *Betula*.

5 Tabela 34 – Volumes, em mL, das patas direita (controle) e esquerda (desafio) medidos em pletismômetro. Ratos foram submetidos a 8 sucessivas injeções subcutâneas com grãos de pólen nas condições descritas acima, seguidas de desafio por injeção subplantar de 50 µg de suspensão de grãos de pólen (50 µL por pata). As médias apresentadas representam as diferenças de volume entre as patas esquerda e direita.

10

Tabaco WT + Al(OH) ₃		<i>Betula</i> em salina		<i>Betula</i> + Al(OH) ₃	
Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.
1,23	1,79	1,29	1,54	1,24	1,36
1,23	1,80	1,35	1,58	1,38	1,28
1,30	1,75	1,28	1,48	1,31	1,34
1,20	1,30			1,40	1,42
				1,32	1,29
Média	0,420		0,227		0,008
Desvio	0,220		0,025		0,081
E.P.M.					

Após oito semanas sucessivas de instilações nasais nos animais do grupo 2, lavados bronco-alveolares foram utilizados para a contagem de células nas condições descritas acima. As contagens celulares indicaram não haver modificação em relação aos animais controle. Estes resultados, em conjunto, indicam para as seguintes conclusões: (i) a resposta alérgica a grãos de pólen injetados subcutaneamente somente ocorre após um número elevado de sucessivas exposições e tende a ser maior na ausência de adjuvante; (ii) não foi possível detectar alterações típicas de resposta alérgica em nenhuma das condições de instilação nasal em ratos. Como houve formação de edemas na condição de injeção subcutânea (tanto com pólen WT quanto com pólen *Betula*) e ausência de alterações típicas de alergia mediante instilação em qualquer das condições avaliadas na presente invenção, os resultados indicam que parece haver uma relação entre a via de apresentação antigênica e o padrão de resposta.

Exemplo 14 - Resposta imune de ratos submetidos a diferentes esquemas de administração de grãos de pólen – detecção de IgG sérico específico contra proteínas de grãos de pólen por Western Blot.

5

10

15

20

25

A formação de IgG's séricos específicos contra proteínas de grãos de pólen foi monitorada através de Western-blot, em que extratos totais de proteínas de pólen WT (selvagem) e pólen GM (contendo a enzima GUS) foram separados por eletroforese, seguida de transferência das bandas para membrana de nitrocelulose. Soros dos animais submetidos a três sucessivas instilações, em intervalos de uma semana cada, com pólen WT ou GM, em *pool*, foram então incubados, separadamente, com a referida membrana (previamente cortada para possibilitar separação das amostras), que após lavada, foi incubada na presença de anticorpos secundários anti-rat-IgG marcados com fosfatase alcalina. A reação colorimétrica com substrato apropriado indicou a detecção de IgG's específicos contra proteínas de grãos de pólen. Conforme indica a Tabela 35, foram detectados, no soro dos animais instilados com grãos de pólen de tabaco "WT" e também no soro dos animais instilados com grãos de pólen de tabaco "GM", anticorpos do tipo IgG específicos contra proteínas dos referidos grãos de pólen. Os resultados destes experimentos, tomados em conjunto, apontam para a viabilidade do uso de grãos de pólen como moduladores da resposta imune em mamíferos. Mais especificamente, estes resultados apontam para a viabilidade do uso de grãos de pólen íntegros como estimuladores da resposta de proteção (formação de IgG sérico específico contra proteínas de grãos de pólen) em mamíferos.

Tabela 35 – Detecção, por Western Blot, de IgGs séricos específicos contra proteínas de grãos de pólen de tabaco WT e GM.

Condição de exposição	Salina	Pólen WT 5 µg	Pólen GM 5 µg	Pólen GM 50 µg
→ IgG sérico	-	+	+	-

A abordagem do uso de grãos de pólen tem, além das outras vantagens mencionadas na presente invenção, a importante característica de requerer quantidades muito baixas de material vegetal para a imunização. Os resultados da tabela 35 demonstram formação de IgG sérico específicos contra proteínas presentes nos grãos de pólen foram após com 3 administrações de 5 µg de grãos de pólen. Embora não tenha sido feito um estudo para definir as quantidades mínimas suficientes para induzir a resposta imune observada na tabela 35, os presentes números oferecem uma base razoável para estimar a quantidade de grãos de pólen que seria necessária para a imunização de humanos. É sabido que o sistema imune humano é considerado como sendo em torno de 100 a 1000 vezes mais sensível que o de murinos, o que significa que, mantendo-se a proporção entre quantidade administrada e peso corporal, apenas algumas dezenas ou centenas de metros quadrados de cultivo seriam suficientes para fornecer vacinas para populações inteiras. Isso possibilita, entre outros, a adoção de medidas simples de contenção de forma a prevenir preocupações com a biossegurança. Além disso, convém lembrar que existem diversas outras estratégias de contenção de grãos de pólen, como irradiação, uso de genes suicidas, e barreiras de infertilidade. A estratégia da presente invenção é particularmente aplicável á vacinação de animais, sendo também útil para combater epidemias e prevenir ou remediar situações decorrentes do uso de armas biológicas ou de ataques terroristas.

Exemplo 15 – Obtenção de construções gênicas para a transformação de plantas destinadas a produzir grãos de pólen com polipetídeos heterólogos em sua superfície externa.

Em uma outra concretização preferencial da presente invenção, a presença de polipeptídeos heterólogos na superfície externa dos grãos de pólen é indispensável, porquanto estar relacionada ao uso de grãos de pólen em reações do tipo antígeno-anticorpo *in vitro*, ou seja, reações úteis para

imunodiagnóstico *in vitro*. Para avaliar esta aplicabilidade, plantas de *A. thaliana* foram transformadas com construções que direcionariam a expressão do polipeptídeo heterólogo em uma localização subcelular compatível com a posterior presença na superfície externa dos grãos de pólen.

5 Para preencher tais requisitos, em uma das concretizações preferenciais da presente invenção o gene codificante do polipeptídeo heterólogo de interesse é fusionado traducionalmente à seqüência codificante do gene AtGRP17 (SEQ 1), sendo a referida fusão controlada por pelo menos uma parte da região promotora da AtGRP17 (SEQ 2), capaz de direcionar a
10 expressão da fusão gênica em tapete de antera. Para preparar a referida construção gênica, as seguintes etapas foram realizadas:

Para a amplificação da região promotora da AtGRP17 e de sua ORF foram utilizados oligonucleotídeos específicos: RR1f (5'ATA AAG CTT TTT CTC TGT TTT TGT CCG TGG AAC) e RR2r (5'ATA CCA TGG CAC GTG ATT CGG TGG
15 AAG TCC TGC C). O plasmídeo pCO27 (descrito por Oliveira *et al* "Inflorescence-specific genes from *Arabidopsis thaliana* encoding glycine-rich proteins". *Plant J.* 3:495-507, 1993; Franco *et al.*, "Distal regulatory regions restrict the expression of *cis*-linked gene to the tapetal cells". *FEBS Letters* 25965:1-6, 2002) foi utilizado como molde para amplificação, por PCR, da
20 região promotora e da ORF da AtGRP17. Usando-se os oligonucleotídeos RR1f e RR2r foi obtido o produto de amplificação ProAtGRP67 (Figura 6) que, após clivagem com as enzimas XbaI e NcoI foi ligado ao plasmídeo pCambia clivado com as mesmas enzimas (Figura 5), dando origem à construção pProAtGRP17_GUSGFP (Figura 7).

25

Exemplo 16 - Transformação de *A. thaliana* e análise da localização do polipeptídeo heterólogo

A construção gênica do exemplo anterior foi introduzida em *E. coli* e em
30 *Agrobacterium tumefaciens* para posterior transformação de *A. thaliana*. A confirmação da transformação das plantas foi realizada através da extração de

DNA genômico por metodologias conhecidas aos versados na arte e por amplificação das regiões heterólogas introduzidas na planta transformada. Alternativamente, a confirmação da transformação foi feita através da análise da expressão e da localização subcelular da atividade da enzima GUS, em
5 reação usando o substrato X-Gluc com conseqüente formação de cor azul. As amostras de tecidos vegetais foram observadas por microscopia estereoscópica e/ou ótica.

A construção gênica (Figura 7), que contém os genes reporter *gus* e *gfp*, foi introduzida em *E. coli* por eletroporação e em *A. tumefaciens* por choque
10 térmico. A confirmação de clonagem foi feita através da análise do perfil esperado de fragmentos gerados pela digestão com enzimas de restrição (Figura 8). Plantas de *A. thaliana* foram submetidas à inoculação de inflorescências com *A. tumefaciens* contendo a referida construção (técnica de transformação chamada "floral dip", descrita por Clough & Bent "Floral dip: a
15 Simplified Method for *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Arabidopsis thaliana*" *The Plant Journal* 16(6):735-743, 1998). As sementes geradas após tal procedimento foram coletadas e semeadas em placas contendo meio seletivo com higromicina. As plântulas selecionadas das placas foram transplantadas para terra em fitotron, onde foram cultivadas em condições que
20 privilegiam a auto-fecundação. Análise das inflorescências destas plantas por microscopia (Figura 9 A-D) confirmou a presença de atividade GUS na localização subcelular esperada, mediante a respectiva reação colorimétrica descrita no exemplo 2. Mais especificamente, atividade da enzima GUS somente é detectada nos estágios tardios do desenvolvimento da antera
25 (Figura 9 A), e ainda mais especificamente no tapete de antera (Figura 9 C).

Exemplo 17 – Detecção da presença do polipeptídeo heterólogo na superfície dos grãos de pólen

30 A transformação de plantas de *A. thaliana* conforme exemplo 16 resultou na obtenção de 11 linhagens que efetivamente produtoras dos polipeptídeos

heterólogos nos grãos de pólen. Tais linhagens foram cultivadas em fitotron e autofecundadas, o que possibilitou a coleta de centenas de sementes. Sementes de cada uma das linhagens foram semeadas diretamente na terra e as plantas resultantes foram cultivadas em fitotron. Após a formação das inflorescências, flores interiras foram coletadas em tubos Eppendorf com o auxílio de bisturi. Os referidos tubos de eppendorf foram adicionados de 100 µL de tampão fosfato 0,1 M pH 7 e vortexados para possibilitar a formação de suspensão de grãos de pólen. Em seguida foi adicionado 1 µL do reativo X Gluc, que em presença da enzima GUS forma um complexo de cor azul após 30 min a 37°C. Frações destas suspensões foram então retiradas com micropipeta e adicionadas sobre lâmina de vidro, para observação ao microscópio. O resultado desta observação (Figura 9 D) indicou a presença do polipeptídeo heterólogo (enzima GUS) ativo no grão de pólen. Estes resultados apontam coletivamente para a viabilidade do uso de grãos de pólen íntegros como reativos para imunodiagnóstico.

Os versados na arte entenderão a partir da presente descrição que qualquer polipeptídeo heterólogo, glicosilado ou não, poderá ser produzido através dos processos da presente invenção. Semelhantemente, combinações de polipeptídeos heterólogos ou ainda fusões traducionais de segmentos de polipeptídeos heterólogos poderão ser produzidas a partir dos ensinamentos da presente invenção, incluindo, mas não limitando a, pelo menos parte de antígenos bacterianos, virais, fúngicos, eucarióticos incluindo animais, humanos, vegetais, parasitários, naturais ou sintéticos, e combinações dos mesmos e também peptídeos terapêuticos, hormônios peptídicos, citocinas, interleucinas e combinações dos mesmos. Os polipeptídeos heterólogos assim produzidos podem ser utilizados em imunoreações das mais diversas, incluindo a imunomodulação de mamíferos e reação imunodiagnósticas *in vitro*. A referida imunomodulação poderá ter finalidade imunoterápica, imunoprotetora ou vacinal, conforme o imunógeno de escolha e/ou conforme a combinação de imunógenos escolhida.

Reivindicações**PRODUTO FARMACÊUTICO E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO**

- 5 1. Produto farmacêutico para uso em imunoreações caracterizado pelo fato de compreender pelo menos parte de tecidos ou células do sistema reprodutivo masculino vegetal que contenha polipetídeos heterólogos em decorrência de modificação genética da planta que produz os referidos tecidos ou células.
- 10 2. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender anteras íntegras ou partes de anteras.
3. Produto farmacêutico, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de compreender grãos de pólen íntegros ou partes de grãos de pólen.
4. Produto farmacêutico, conforme reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos parte de polipeptídeos ao menos parcialmente purificados de tecidos e/ou células do sistema reprodutivo masculino vegetal.
- 15 5. Produto farmacêutico, conforme reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é selecionado do grupo que compreende pelo menos parte de antígenos bacterianos, virais, fúngicos, eucarióticos incluindo animais, humanos, vegetais, parasitários, naturais ou sintéticos, e combinações dos
- 20 mesmos e também peptídeos terapêuticos, hormônios peptídicos, citocinas, interleucinas e combinações dos mesmos.
6. Produto farmacêutico, conforme qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a referida imunoreação é a imunomodulação de mamíferos.
- 25 7. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a referida imunomodulação é destinada a uma imunoterapia.
8. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a referida imunoterapia é destinada ao tratamento de alergias.
9. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de
- 30 que a referida imunoterapia é destinada ao tratamento de doenças autoimunes.

10. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a referida imunoterapia é destinada ao tratamento de câncer.
11. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a referida imunomodulação é destinada à vacinação de mamíferos.
- 5 12. Produto farmacêutico, conforme reivindicações 6 a 11, caracterizado pelo fato de que a referida imunomodulação decorre de administração parenteral a mamíferos.
13. Produto farmacêutico, conforme reivindicações 6 a 11, caracterizado pelo fato de que a referida imunomodulação decorre de administração em mucosas
- 10 de mamíferos.
14. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a referida mucosa é a mucosa nasal.
15. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a referida mucosa é a mucosa pulmonar.
- 15 16. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a referida mucosa é a mucosa oral ou sublingual.
17. Produto farmacêutico, conforme reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a referida imunoreação é uma imunoreação *in vitro*.
18. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 17, caracterizado pelo fato
- 20 de que as referidas imunoreações compreendem células que interagem com o referido produto farmacêutico.
19. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que as referidas imunoreações compreendem moléculas que interagem com o referido produto farmacêutico.
- 25 20. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que as referidas moléculas são anticorpos ou partes de anticorpos.
21. Produto farmacêutico, conforme reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que as referidas moléculas são antígenos ou partes de antígenos.
22. Processo de produção de produto farmacêutico para uso em imunoreações
- 30 caracterizado por compreender o cultivo de planta modificada geneticamente

capaz de dar origem a tecidos ou células do sistema reprodutivo masculino vegetal compreendendo polipeptídeos heterólogos.

23. Processo, conforme reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a referida planta é modificada com sequências gênicas que compreendem pelo menos parte de uma região promotora funcionalmente ligada a uma sequência gênica codificante de pelo menos parte de um polipeptídeo heterólogo, de maneira que o referido polipeptídeo heterólogo esteja compreendido em tecidos ou células do sistema reprodutivo masculino vegetal.

24. Processo, conforme reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a referida região promotora compreende qualquer sequência nucleotídica capaz de direcionar a expressão do referido polipeptídeo heterólogo em anteras ou em qualquer localização subcelular de anteras.

25. Processo, conforme reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a referida região promotora compreende qualquer sequência nucleotídica capaz de direcionar a expressão do referido do polipeptídeo heterólogo de forma a acarretar a presença do referido do polipeptídeo heterólogo em grãos de pólen maduros.

26. Processo, conforme reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida região promotora compreende qualquer sequência nucleotídica capaz de direcionar a expressão do referido do polipeptídeo heterólogo nas células dos grãos de pólen maduros.

27. Processo, conforme reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que:

- a referida região promotora compreende qualquer sequência nucleotídica suficiente para direcionar a expressão em tapete de antera;
- esta sequência esteja funcionalmente ligada à sequência codificante de pelo menos parte de uma proteína tipo-oleosina, sendo que;
- a referida sequência que codifica pelo menos parte de uma proteína tipo-oleosina é fusionada traducionalmente a uma sequência que codifica pelo menos parte de um ou mais polipeptídeos úteis em imunoreações.

28. Processo, conforme reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a referida região promotora compreende pelo menos parte da sequência SEQ. 2.

29. Processo, conforme reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a referida sequência que codifica pelo menos uma região de uma proteína tipo-oleosina compreende pelo menos parte da sequência SEQ. 1.

1- 30. Processo, conforme reivindicações 22 a 29, caracterizado pelo fato de que o referido polipeptídeo heterólogo é selecionado do grupo que compreende pelo menos parte de antígenos bacterianos, virais, fúngicos, eucarióticos incluindo animais, humanos, vegetais, parasitários, naturais ou sintéticos, e combinações dos mesmos e também peptídeos terapêuticos, hormônios peptídicos, citocinas, interleucinas e combinações dos mesmos.

ANEXO – FIGURAS

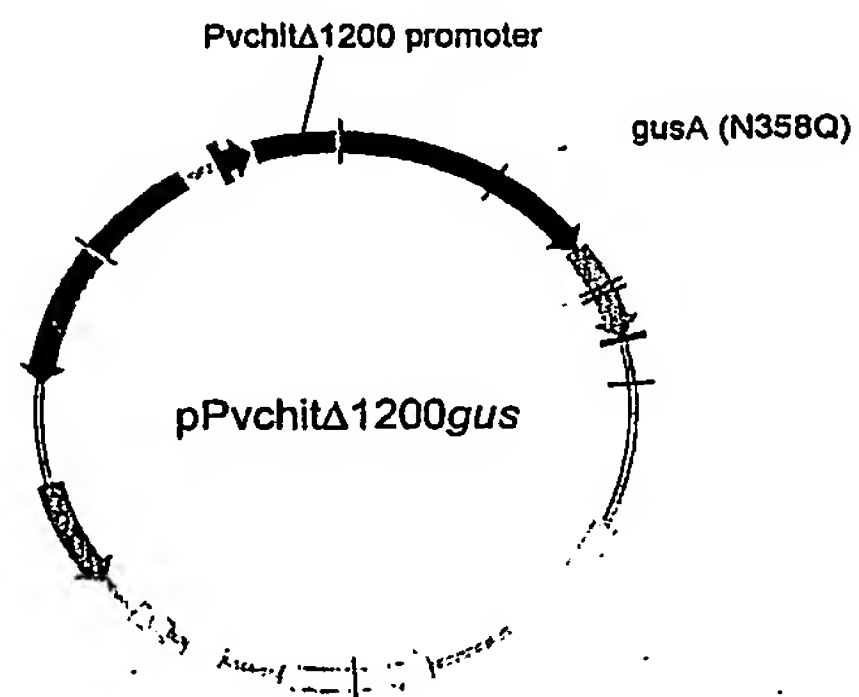


Figura 1. Representação esquemática do plasmídeo binário pPvchitΔ1200gus, utilizado como vetor do gene marcador GUS (em azul) sob o controle de um segmento (-1200) do promotor de quitinase de feijão.



Figura 2 Fotografia de flor de tabaco, evidenciando as anteras.

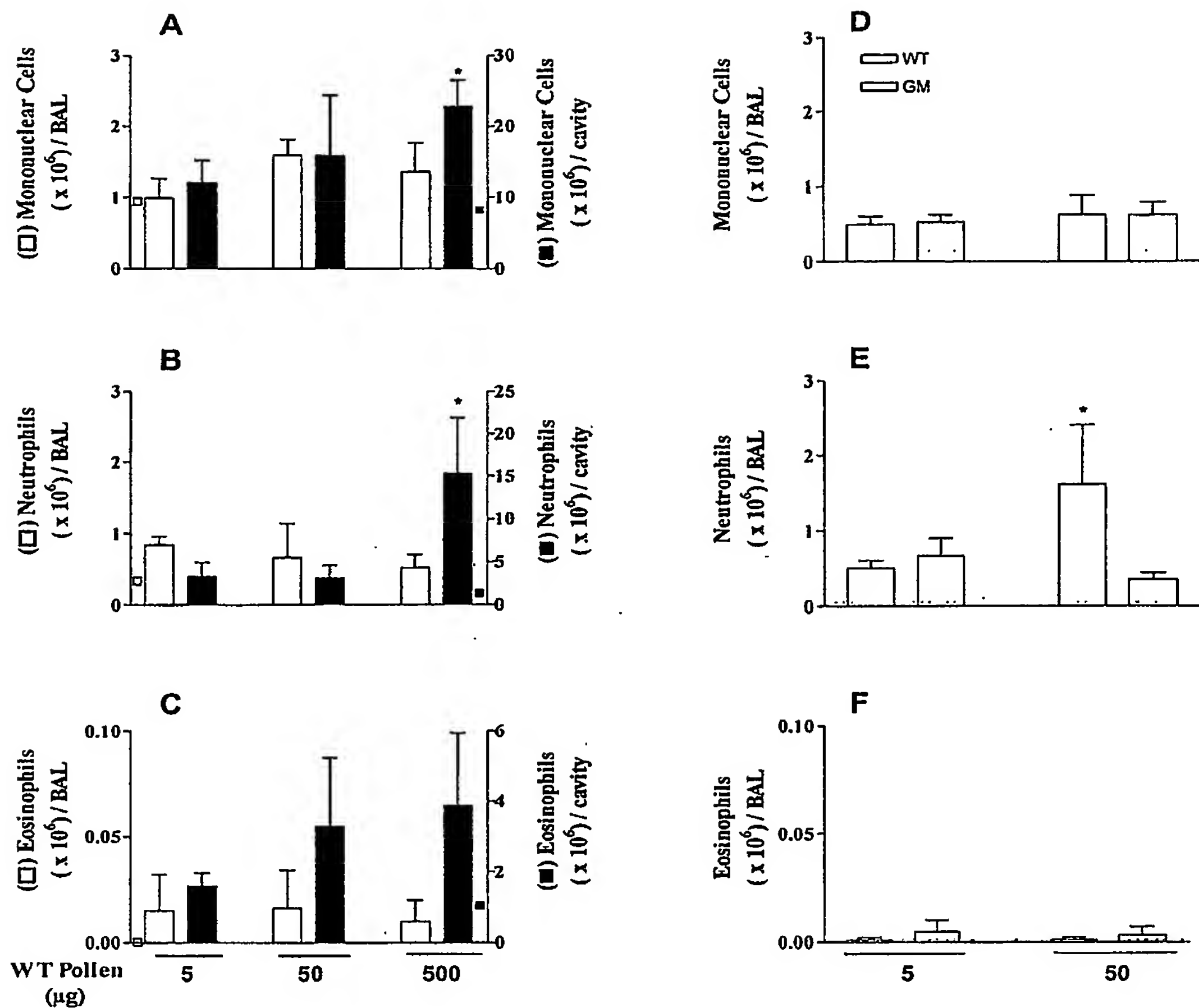


Figura 3. Contagens de células mononucleares A), neutrófilos B) e eosinófilos C) em lavado alveolar (BAL) de ratos submetidos a três instilações consecutivas de grãos de pólen nas concentrações indicadas e em lavado pleural de ratos submetidos a injeções intrapleurais de grãos de pólen nas mesmas concentrações. □ e ■ representam valores médios dos controles de BAL e pleural, respectivamente. C), D) e F) representam, respectivamente, as contagens de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos de lavado bronco alveolar de ratos submetidos a três instilações consecutivas de grãos de pólen WT ou GM, nas concentrações indicadas. Linhas tracejadas representam valores médios dos controles instilados com salina. Colunas representam médias \pm E.P.M. e asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

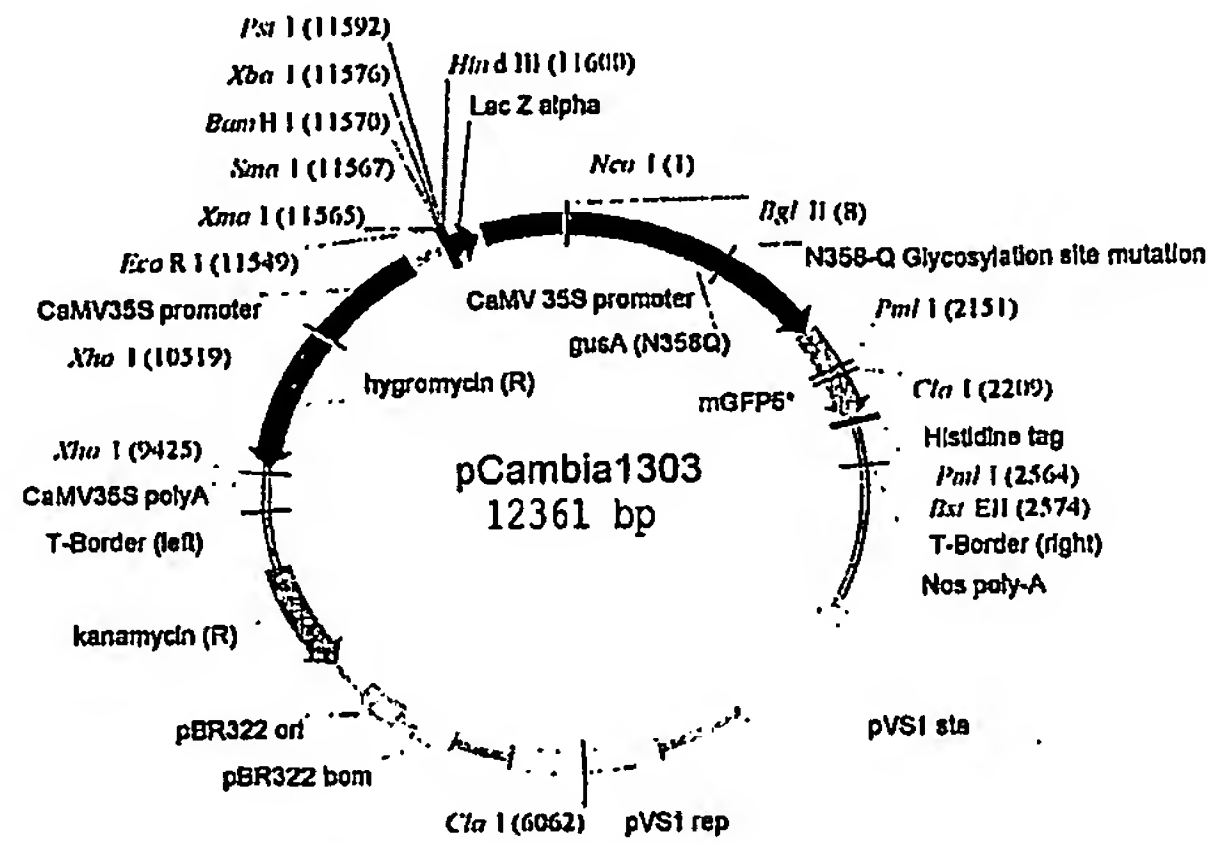


Figura 4. Representação esquemática do plasmídeo binário pCambia 1303, utilizado como vetor doador dos genes marcadores GFP, GUS e dos genes de seleção a canamicina e higromicina. Os sítios únicos de clonagem *Xba*I e *Nco*I e os demais sítios únicos e duplos também estão indicados.

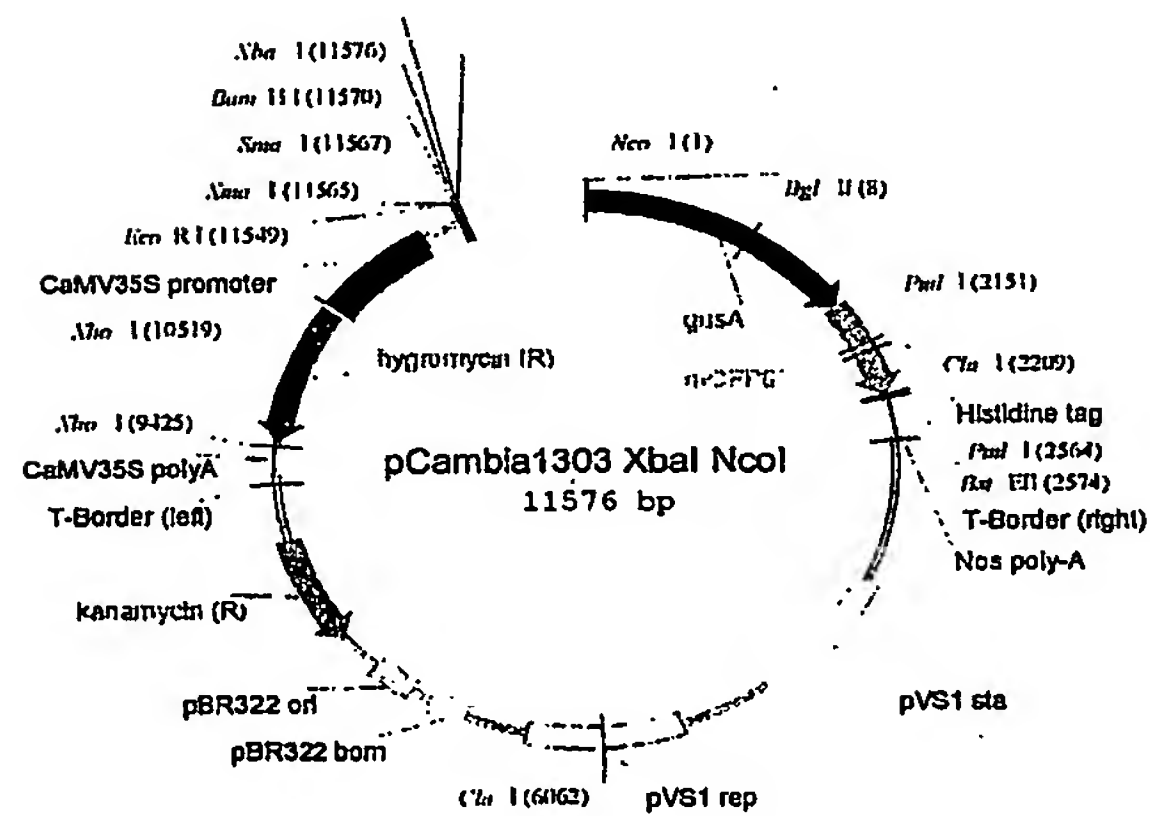


Figura 5. Representação esquemática do plasmídeo binário pCambia1303, desprovido da sequência promotora do 35S do CaMV através da digestão com as enzimas *Xba*I e *Nco*I. Os demais sítios únicos e duplos de restrição também estão indicados.

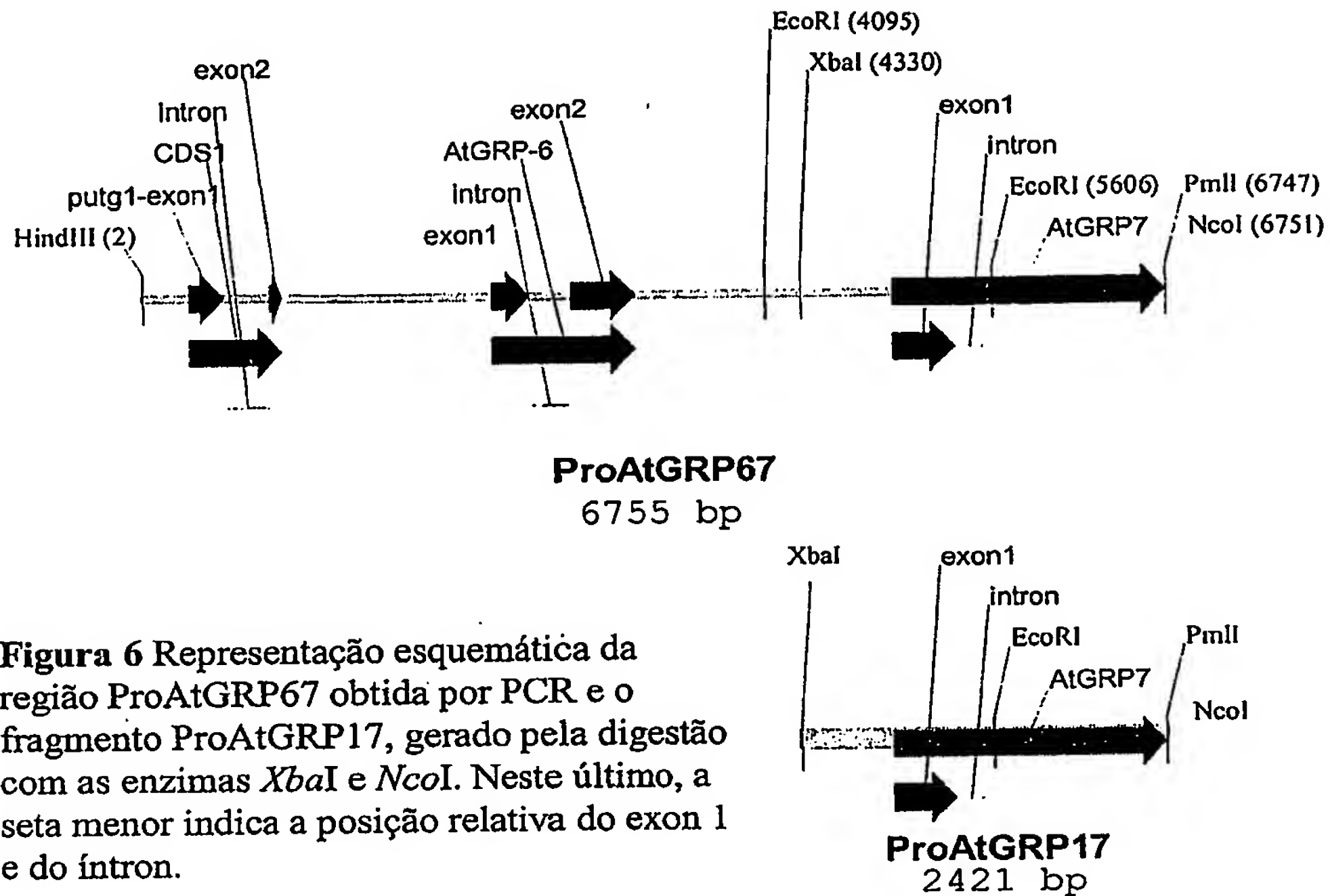


Figura 6 Representação esquemática da região ProAtGRP67 obtida por PCR e o fragmento ProAtGRP17, gerado pela digestão com as enzimas *XbaI* e *NcoI*. Neste último, a seta menor indica a posição relativa do exon 1 e do íntron.

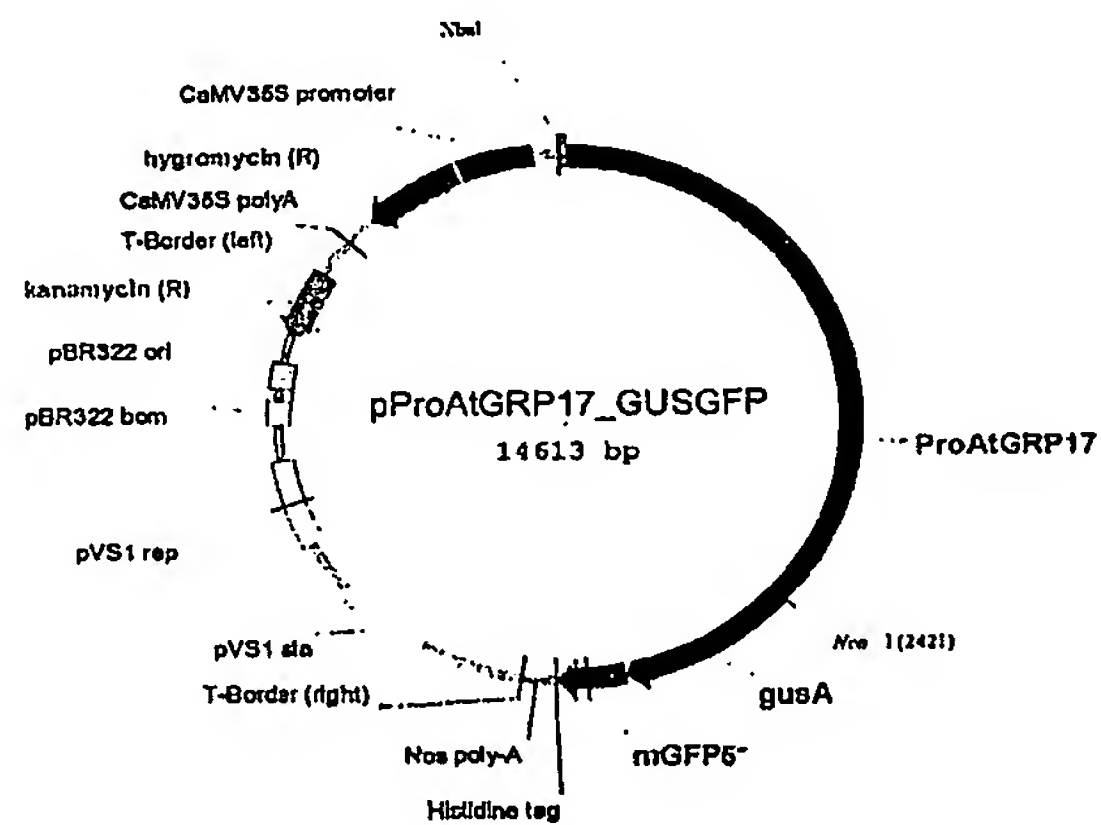


Figura 7. Representação esquemática do plasmídeo pProAtGRP17_GUSGFP, resultante da clonagem produto de PCR ProAtGRP67 digerido com as enzimas *XbaI* e *NcoI* no plasmídeo pCAMBIA1303 digerido com as mesmas enzimas. Uma região de 616 correspondente a parte do promotor AtGRP17 mais a ORF do gene AtGRP17 estão indicadas como ProArGRP17. Os genes marcadores GUS e GFP são também assinalados. Os sítios únicos de clonagem *XbaI* e *NcoI* estão indicados.

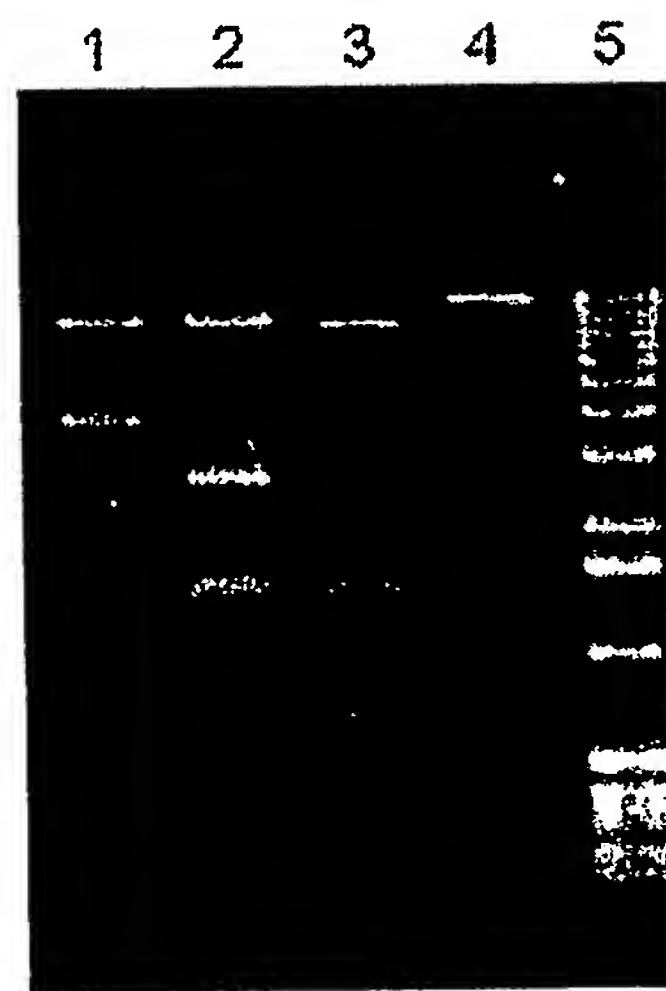


Figura 8. Gel de agarose 1% contendo os fragmentos esperados de DNA obtidos após digestão, com as enzimas indicadas, dos plasmídeos extraídos de *E. coli* XL1 transformadas. 1, pCambiaProAtGRP17 *PvuII*; 2, pCambiaProAtGRP17 *BglII*; 3, pCambia *PvuII*; 4, pCambia *BglII*; 5, marcador 1kb ladder.

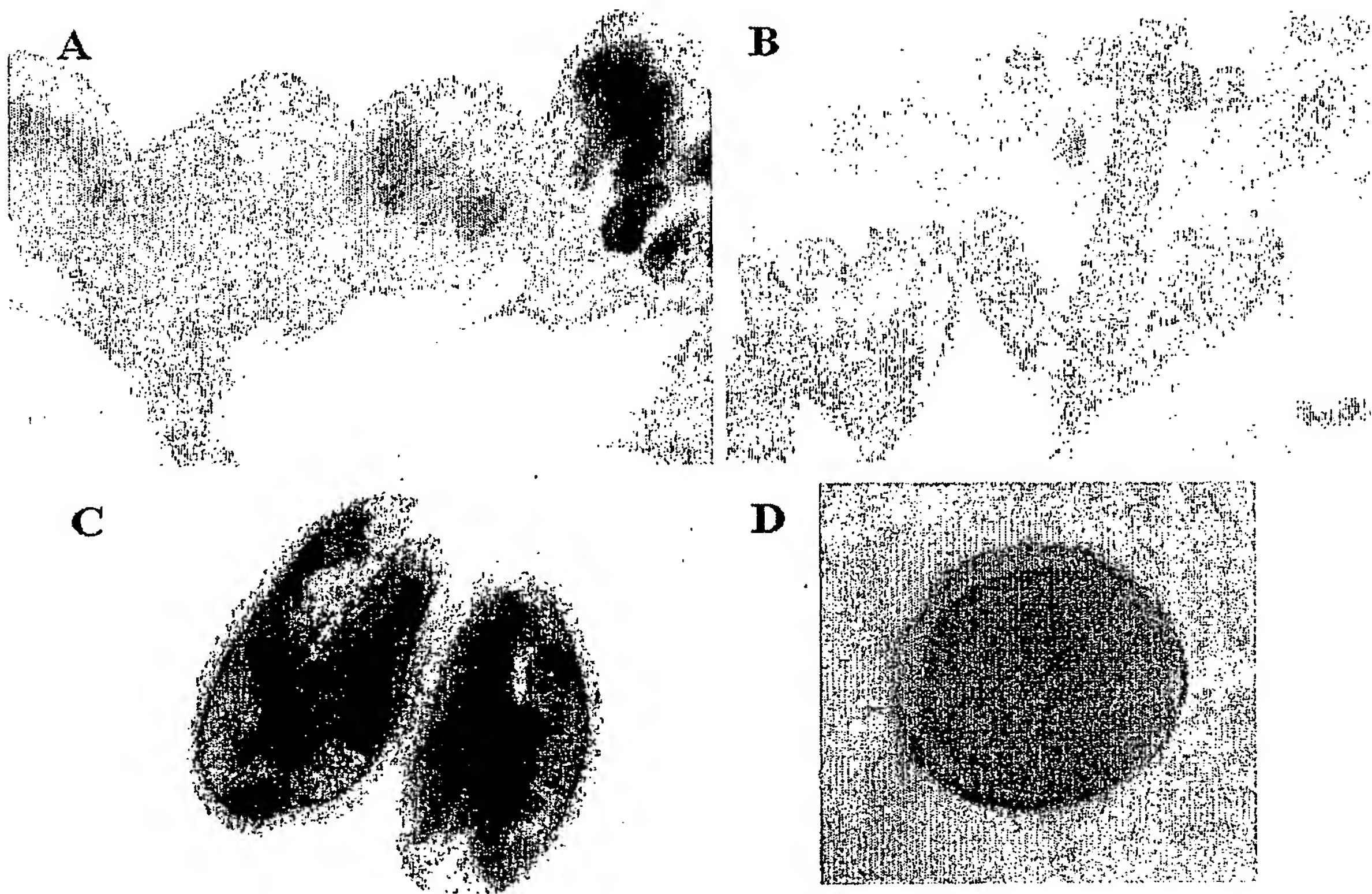


Figura 9. Estruturas florais de *A. thaliana* transformada com o plasmídeo pCambiaProAtGRP17GUSGFP. Painel **A)** mostra a presença e atividade de GUS no final do desenvolvimento das anteras, mas não nos estágios iniciais do desenvolvimento. Painel **B)** mostra inflorescências da mesma planta em que a atividade de GUS pode ser vista em anteras de flor imatura (à esquerda) e nas anteras e pétalas da flor madura (à direita). Painel **C)** mostra intensa atividade de GUS no tapete e sobre os grãos de pólen. Painel **D)** mostra um grão de pólen com marcação positiva para GUS. Todas as fotografias foram tiradas sob microscópio ótico.

Listagem de Sequências

Dados do requerente:

(a) Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO E FUNDAÇÃO
OSWALDO CRUZ

(b) Endereço: UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av.
Brigadeiro Trompowski, s/nº; Cidade Universitária, Rio de Janeiro
– RJ.; FIOCRUZ – Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro – RJ

Título da Invenção: PRODUTO FARMACÊUTICO E PROCESSO
PARA SUA PRODUÇÃO

Número de sequências constantes do pedido: 2

Seq. n° 1

Tamanho: 1629 pares de base

Tipo: cDNA

Nome do gene: AtGRP17

Função: proteína tipo-oleosina

SEQ 1: Sequência completa da região codificante da AtGRP17 (4940-5358)
+ (5545-6757)

```

          a tgagcgaaga actaagtcaa aagccatcat cagctcagtc
4981 tctgtcactg agagaggggca gaaatagggt tccttttctg tccctgtcac
agagagaggg
5041 cagatttttt ctttctctat ctctttcaga gagagatgga agaaagtttt
cttttctcag
5101 tatgttctct tttctcatgc cactgttgga ggattattaag attattattg
cttctgtggc
5161 ctccgtaatc ttcgtcgggt tcgcctgtgt aacctcgcct ggttctgccg
cagcattagt
5221 cgtaagcacc ccggttttca tcatatttag tcctgttctc gtaccagcta
cgatagccac
5281 ggttgtcttg gcgacaggat tcacggccgg tggctctttt ggagcgacgg
cacttggtct
5341 catcatgtgg cttgttaagt aagattatta taacagctta tattgagatc
actcgagatt
5401 tatgcttaat tatataatat tcataaacct atagtttaaa agtatattga
acttcatttg
5461 ttaacgtact ttataaatat tgaacttcgt tcgttttctt aattgggtctc
taagtatat
5521 tacatacttt tttgtgtgat gcagacgtag gatgggagta aagccgaagg
ataatccacc
5581 tccggcagga cttccaccga attcgggagc aggagcagga ggagctcaaa
gtctgatcaa
5641 aaagtcaaag gcaaagtcta aagggtgggct taaggcttgg tgtaagaaga
tgtaaaaaag
5701 taaattcggg ggtaaaaaag gcaagtccgg ggggtggaaa agtaaatttg
gaggtaaagg
5761 cggtaagtcc gaaggatgaag aaggatatgc gtctggggat gaaggatatg
ctggaagtga
5821 aggaggtatg tccggagggtg aaggaggtaa atccaaaagt ggaaaaggta
aactcaaagc
5881 taaactcgaa aagaaaaaag gtatgtccgg aggggccgag agtgaagaag
gtatgtctgg
5941 aagtgaagga ggtatgtctg gtgggtggagg aagtaaattcc aaaagtaaaa
aaagtaaact
6001 caaagctaaa ttgggaaaga aaaaagggtat gtccggaggc atgtcaggaa
gtgaagaagg
```

6061 tatgtctgga agtgaaggag gtatgtccag tgggtggagga agtaaatacca
 aaagtaaaaa
 6121 aagtaaactc aaagctaaat tgggaaagaa aaaaggatatg tccggaggca
 tgtcaggaag
 6181 tgaagaaggt atgtctggaa gtgaaggagg tatgtccgga ggtggaggag
 gtaaatacca
 6241 aagtagaaaa agtaaactca aagctaaatt gggaaagaaa aaatgtatgt
 ccggaggcat
 6301 gtcaggaagt gaaggaggta tgtctggaag tgaaggaggt atatccggag
 gtggtatgtc
 6361 tgggggcagt ggaagtaaac acaaaattgg aggaggtaaa cacggaggtc
 ttggaggtaa
 6421 attcggaag aaaagaggca tgtccggaag tggaggaggc atgtcaggaa
 gtgaaggagg
 6481 tgtgtctgga agtgaaggaa gtatgtctgg aggtggtatg tctgggggta
 gcggaagtaa
 6541 acacaaaatt ggaggaggta aacacggagg tcttagaggt aaattcggaa
 agaaaagagg
 6601 tatgtcagga agtgaaggag gtatgtctgg aagtgaagga ggtatgtcgg
 aaagtggat
 6661 gtccgggagt ggagggggta aacacaaaat cggaggagggt aaacacaaat
 ttggaggagg
 6721 taaacacgga ggtggagggtg gccacatggc ggagtaa

Sequência proteica traduzida de AtGRP17

MSEELSQKPSSAQSLSLREGRNRFPLSLSQREGRRFFPSLSLSE
 RDGRKFSFLSMFSFLMPLLEVIKIIIASVASVIFVGFACVTLAGSAAALVVSTPVFII
 FSPVLVPATVVLATGFTAGGSFGATALGLIMWLKRRMGVKPKDNPPPAGLPPNS
 GAGAGGAQSLIKKSKAKSKGGLKAWCKMLKSKFGGKKKGKSGGGKSKFGGKGGKSEGE
 EGMSSGDEGMSGSEGGMSGGEGGKSKSGKGLKAKLEKKKGMSGGSESEEGMSGSEGG
 MSGGGGSKSKSKSKLAKLGKKKGMSGGMSGSEEGMSGSEGGMSGGGGSKSKSKKSK
 LKAKLGKKKGMSGGMSGSEEGMSGSEGGMSGGGGGKSKSRKSKLAKLGKKKCMMSGM
 SGSEGGMSGSEGGISGGMSGGSGSKHKIGGGKHGGLGGKFGKKRMSGSGGGMSGSE
 GGVSGSEGSMSGGGMSGGSGSKHKIGGGKHGGLRGKFGKKRMSGSEGGMSGSEGGMS
 ESGMSGSGGGKHKIGGGKHGGLGGKFGGGKHGGGGHMAE

Seq. nº 2

Tamanho: 1658 pares de base

Tipo: DNA

Nome do promoto: ProAtGRP17

Função: promotora

SEQ 2: Sequência completa da região promotora da AtGRP17 (3371-4939)

3371 acaaagaaat taactatgaa acaatgcttt gtttaaataga agtaattaat
3421 cgggtactata gcgtatatatac atagaatgga tccaatttaa ccaaagcaac
tgtatgtgac
3481 tatgtgaatg attcaatcgt gagacattga aattgtcgtt tctccattac
cttttttgaa
3541 gaaaaacat cgaaagctag ctaagacttt ttttattaaa cgaacttgct
actatttcta
3601 tgttttcttt gaaatgaaaa tttaatttgt tactgtttca cctaaaactc
aaaagtattg
3661 cttttttaatt ttattattaa gaaaaactaa tcttatttat gttaagaaac
ctgtcaattt
3721 ttcattgtta atttcggctc tataattatt aattaacaat caatttctca
aaaattgcaa
3781 tcatgattat gattagatat atattagttg gattgtgatg cattttttgt
aatataaaat
3841 ggatgtttgt attagtttct cactcatgta attaaacacc aaatgctaga
aactagtact
3901 tttgtttctc agctctcgtc tattgttata tctgcaacac gaacaaaaac
cttatctagg
3961 tggtatatat cacggttatg tttatgagtt agaagggatt cttcaacaaa
aatcacggaa
4021 ctacttgat atatgtatgt gtgtatccga tcgaggttga cttccggggt
tggacgttga
4081 agaagacgaa ttcattgatt gggcttatat atgggcatgt attacttgg
tcaagtgtt
4141 aacactttta gctttttcaa ttctattcga aaccaaataa ttgggctata
tatctttata
4201 caaccttcaa gataaattgg accaatttta gaagagcaaa ttgaaccggg
ccgttagcgt
4261 tagccaaacc ccaactcctt ttcagtacaa tttaatcaag aatttcta
aatcgtgaa
4321 tttctagaca tacatatcat aatttcgtca aagcgagcct acacctagt
ttgagctaca
4381 taactctttt cttttttttt ttatgattag gaggtttcaa aacccttgg
cccataattt
4441 cttataatta gttttgtaat actaaattta ccattgagag cgacctctcg
tcactagtaa
4501 ttcgaagatc tcatattcat gacctatatt aacctcttc cagtcaagta
atttcaatcg
4561 aaattcatca aaatcatata tttaacttag taatcacata tgatatggct
aatatacgt
4621 atataacgat aaagatttct tcacgctttg atattccata aagcaatgga
aatatggaat
4681 ggaagaaaac atttgaattt tacaagaaac aataaataga aggcctacaa
aacatgacaa
4741 cccacacaca cacacacgaa aagagaaaat ataaagaagg acatgtaacg
tgacgtagcg
4801 tagatctcca ttcactcaa tcgttttgca tggagcatgc atgtgtgtgt
accgtgcacg

4861 tagtagagac cacacaactc cttcataaaa gccctctctc tcttaccatc
accaaaacac

4921 aacaatccga tcagaaaat

Resumo

63

PRODUTO FARMACÊUTICO E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO

- 5 São revelados produtos farmacêuticos úteis no tratamento de alergias, doenças autoimunes, na vacinação de mamíferos, e em aplicações diagnósticas *in vitro*, estes produtos compreendendo grãos de pólen que contêm sua composição protéica alterada através de modificação genética na planta que o produz; o processo de produção dos referidos produtos
- 10 farmacêuticos compreende o cultivo de plantas com modificação genética que proporciona a alteração da composição molecular dos grãos de pólen.